

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANILLO GARDENAL AUGUSTO

O POLIMORFISMO DOS GENES *KIR* EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS E NA  
DOENÇA AUTOIMUNE PÊNFIGO FOLIÁCEO

Tese entregue à banca avaliadora para obtenção  
do título de doutor, pelo Programa de Pós-  
Graduação em Genética, da Universidade  
Federal do Paraná.

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler.

CURITIBA  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANILLO GARDENAL AUGUSTO

O POLIMORFISMO DOS GENES *KIR* EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS E NA  
DOENÇA AUTOIMUNE PÊNFIGO FOLIÁCEO

CURITIBA  
2012

*A todos os pacientes de pênfigo. Que suas dores sejam sanadas e os  
sonhos reconstruídos.*

## AGRADECIMENTOS

À professora Luiza, pela amizade construída nesses anos de trabalho, pela confiança e pela orientação. Acima de tudo, pelo exemplo.

A todos os pacientes e controles de pênfigo foliáceo, que aceitaram participar dessa pesquisa, mesmo que sem conseguir compreender exatamente o nosso trabalho.

Ao Hospital Adventista do Pênfigo, especialmente Marley Cafaro, que não só permite as nossas coletas, mas que nos recebe da melhor maneira possível, sendo sempre gentis, prestativos e amáveis. Além disso, pelo trabalho excepcional no tratamento dos pacientes de pênfigo, que não só recebem medicamentos e cuidados médicos, mas também carinho e calor humano.

À Mary Carrington e Pat Martin, que me aceitaram para o estágio no exterior e participaram desse projeto. Além disso, obrigado pelos momentos especiais, como por exemplo, a noite de Natal que poderia ser fria (congelada) e solitária, mas invés disso foi aconchegante e inesquecível.

A todos do National Cancer Institute (NCI), que ajudaram de alguma forma, em especial Fuh-Mei Duh, que com sempre esteve foi atenciosa em todo instante. Também a toda equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana, pela ajuda, amizade, pelos momentos compartilhados ao longo desses seis anos em que pertencem a essa equipe. Vocês merecem muitos LGMH Awards®!

Márcia Pincerati, como eu prometi, um tópico de agradecimento só para você (e o maior!). E são muitos os motivos: pela formidável companhia no subúrbio dos Estados Unidos (sem você, acho que me enforcava!); pelas aventuras na neve, o que inclui a viagem deslizante de carro para o desastroso Reveillon de Nova York que findou com batida no pára-choque do carro do oficial de imigração; pela companhia no ritmo de trabalho intenso no NCI, que nunca tinha hora pra acabar; pela ajuda com a genotipagem e sequenciamento; pelas idéias, discussões e sugestões... faltou alguma coisa? Ah, sim! Pela sua amizade e super bom humor.

Ao Rodrigo Francisco, pela paciência, discussões produtivas e idéias.

Ao Reginaldo e Érica, e por que não o Billy, por terem se tornado a minha família.

Por falar em família, aos meus pais, que sempre me incentivaram, mesmo sem conseguir compreender minhas escolhas, às vezes, um tanto quanto loucas. Pelo apoio incondicional.

Às professoras Marina Almeida, Lupe Furtado e Eleidi C. Freire Maia, por me ajudarem com as análises e idéias.

À professora Ilíada Rainha, por ceder alguns *primers* para algumas confirmações de tipagens.

***“Triste época! É mais fácil desintegrar um átomo  
que um preconceito.”***  
*Albert Einstein*

## RESUMO

A família *KIR* apresenta grande diversidade e reconhece os antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I; poucas populações brasileiras foram estudadas. O objetivo desse estudo foi caracterizar a diversidade *KIR* em populações brasileiras e comparar com outras populações já descritas, analisando os variantes *KIR* no contexto de seus ligantes HLA. Nós estudamos o polimorfismo de ausência e presença de todos os genes de *KIR* e também a diversidade alélica de *KIR3DL2*, verificamos se esses genes interferem na susceptibilidade ao pênfigo foliáceo (PF), uma doença autoimune bolhosa da pele. A população de Curitiba apresentou frequências similares a populações européias e euro-descendentes, mas por ser miscigenada, mostrou uma maior diversidade de perfis genéticos. Os genes *HLA-A* e *-B* parecem ser igualmente importantes para o reconhecimento KIR. Nossos resultados acerca dos ligantes e receptores foram compatíveis com baixa ou ausência de força seletiva favorecendo combinações KIR-HLA. Os genes ativadores parecem exercer um efeito redundante (sobrepeso) na susceptibilidade ao PF e a presença de mais de três genes ativadores foi protetora (OR=0.49,  $P=0.003$ ). Associação protetora foi encontrada para maiores razões ativadores/inibidores (OR=0.44,  $P=0.001$ ). *KIR3DS1* e o epítipo HLA-Bw4 foram negativamente associados ao PF, tanto isoladamente quanto combinados, mas o efeito protetor foi maior para a presença dos dois (OR = 0.22,  $P<10^{-3}$ ), sugerindo que a função ativadora de KIR é o principal fator interferindo na patogênese de PF. A frequência de indivíduos que apresentaram o alelo *KIR3DL2\*001* foi maior em pacientes (OR=1.9,  $P=0.01$ ). Nós analisamos os polimorfismos de nucleotídeo único na região codificadora de *KIR3DL2* e o alelo *1190T* foi associado à proteção (OR=0.53,  $P=0.025$ ). Grande diversidade alélica de *KIR3DL2* foi observada em populações urbanas, em concordância com origem a partir de mistura de europeus, africanos, indígenas, asiáticos e mediterrâneos ao longo dos últimos séculos. Baixa diversidade alélica foi encontrada nos indígenas provavelmente devido ao efeito de gargalo populacional que eles sofreram no processo de migração para a América. Dezesesseis novos alelos foram encontrados. Ainda há pouca informação sobre os alelos de *KIR* para a maioria das populações mundiais. Conhecer essa diversidade é crucial para compreendermos como a variabilidade desses genes interfere nas respostas imunes normais e nas doenças.

## ABSTRACT

The *KIR* gene family exhibits extensive diversity and interacts with the highly polymorphic human leukocyte antigens (HLA) class I; few Brazilian populations have been described so far. This study aimed to characterize the *KIR* diversity in Brazilian populations, to compare with other populations described and to analyze *KIR* variants in the context of their relationship with their known HLA class I (-A, -B and -C) ligands. We studied both presence/absence polymorphism of all *KIR* genes and also the allelic diversity of *KIR3DL2* and we also investigated if the *KIR* polymorphism influences the susceptibility to pemphigus foliaceus (PF), an autoimmune blistering disease of the skin. The Curitiba's population was similar to European and Euro-descendant populations, but as an admixed population, showed more diversity of profiles. The *HLA-A* and *-B* genes appear to be equally important for NK cell function and our result of ligands and receptors was compatible with low or absent selection pressure favoring certain *KIR*-HLA combinations. The activating *KIR* genes may exert an overlapping effect on PF susceptibility and the presence of more than three activating genes was protective (OR = 0.49,  $p = 0.003$ ). A significant protective association was found for higher ratios of activating to inhibitory *KIR* (OR=0.44,  $p=0.001$ ). *KIR3DS1* and the HLA-Bw4 epitope were negatively associated to PF either isolated or combined, but an increased protective effect was found for the presence of both (OR = 0.22,  $p<10^{-3}$ ) suggesting that the activating function is the major factor interfering in the PF pathogenesis. The frequency of individuals with the *KIR3DL2\*001* allele was increased in patients (OR = 1.9,  $p = 0.01$ ). We looked at the informative single nucleotide polymorphisms in the sequenced coding region of *KIR3DL2* and the allele *1190T* was associated to a lower risk (OR = 0.53,  $p = 0.025$ ). High allelic diversity of *KIR3DL2* was observed in our urban populations, in agreement with the history of the Brazilian population that was formed by European, African, Amerindian, eastern Asian and Middle Eastern admixture over the last few centuries. Low allelic diversity was found in Amerindians when compared to urban populations, as expected considering the founder effect that the Amerindians may have suffered during the migration to America. Sixteen new alleles were found. Allelic information is still lacking in most of the *KIR* studies and for the majority of the populations worldwide. Yet, this knowledge is crucial to comprehend the role that the variability of these genes plays in health and in disease.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. GENES <i>KIR</i>.....</b>	<b>13</b>
2.1 A célula exterminadora natural .....	13
2.2 NK em ação .....	13
2.3 Receptores das NK e a licença para matar .....	14
2.4 Regulação do ataque das NK .....	14
2.5 Dois agrupamentos de genes dos receptores codificam grande parte dos receptores das NK .....	17
2.6 Receptores semelhantes a imunoglobulinas – <i>KIR</i> .....	17
2.7 Diversidade Genética de <i>KIR</i> .....	24
2.8 Diversidade haplotípica .....	24
2.9 Diversidade alélica .....	27
2.10 <i>KIR2DL4</i> .....	28
2.11 <i>KIR3DL2</i> .....	30
2.12 Imunogenética das NK .....	31
<b>3. PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO: UMA DOENÇA DA EPIDERME .....</b>	<b>33</b>
3.1 Aspéctos gerais e históricos.....	33
3.2 Aspectos imunológicos do fogo selvagem e etiologia .....	36
3.3 Pênfigo – Uma doença complexa .....	37
3.4 A Genética e ambiente no contexto do pênfigo foliáceo .....	37
3.5 Tratamento .....	38
3.6 O papel das NK na autoimunidade .....	39
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 Objetivos gerais.....	41
4.2 Objetivos específicos.....	41
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>



5.1 Diversity of the <i>KIR</i> gene cluster in an urban Brazilian population .....	43
5.2 Activating KIR and their HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering disease of skin .....	55
5.3 <i>KIR3DL2</i> high resolution allele typing by the sequence-based typing (SBT) method.....	79
5.4 <i>KIR3DL2</i> alleles are associated to differential susceptibility to the autoimmune disease pemphigus foliaceus. ....	90
5.5 Characterization of the highly polymorphic <i>KIR3DL2</i> in Amerindian and urban Brazilian populations: ten new alleles were found. ....	103
<b>6. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>120</b>
6.1 Ausência e presença de <i>KIR</i> e seus ligantes em populações .....	120
6.2 Ausência e presença de KIR e seus ligantes em penfigo foliáceo.....	121
6.3 Método de genotipagem de <i>KIR3DL2</i> .....	122
6.4 Alelos de <i>KIR3DL2</i> em populações e em pênfigo foliáceo.....	123
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>130</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>131</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>132</b>
<b>ANEXO: MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>140</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Receptores das células NK. ....	15
<b>Figura 2</b> Balanço de sinais ativadores e inibidores no controle da ativação das NK. ....	16
<b>Figura 3</b> Organização dos agrupamentos de genes localizados nos cromossomos 19 (LCR) e 12 (NKC), que codificam receptores de células NK. ....	18
<b>Figura 4</b> Localização cromossômica e representação esquemática da organização das famílias gênicas do LRC. ....	19
<b>Figura 5</b> Organização interna dos genes KIR e correspondência entre os exons e os domínios proteicos. ....	21
<b>Figura 6</b> representação esquemática da estrutura das moléculas KIR. ....	22
<b>Figura 7</b> Diferentes clones de células NK de um mesmo indivíduo expressam subconjuntos parcialmente sobrepostos de KIR. ....	23
<b>Figura 8</b> Lista de haplótipos KIR. ....	26
<b>Figura 9</b> Esquema geral das camadas da pele. ....	34
<b>Figura 10</b> Lesões de pênfigo vulgar e pênfigo foliáceo. ....	35

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Número de alelos e proteínas KIR .....	29
<b>Tabela 2</b> Testes de neutralidade seletiva .....	126

## LISTA DE ABREVIações

<b>CTL</b>	<i>Linfócito T citotóxico</i>
<b>Dsg</b>	<i>Desmogleína</i>
<b>GKW</b>	<i>Guarani Kaiowá</i>
<b>GND</b>	<i>Guarani Nandeva</i>
<b>GRC</b>	<i>Guarani de M'Byá</i>
<b>HLA</b>	<i>Antígenos leucocitários humanos</i>
<b>Ig</b>	<i>Imunoglobulina</i>
<b>IL</b>	<i>Interleucina</i>
<b>INF</b>	<i>Interferon</i>
<b>IPD</b>	<i>Immuno Polymorphism Database</i>
<b>ITAM</b>	<i>Motivo ativador baseado em tirosina</i>
<b>ITIM</b>	<i>Motivo inibidor baseado em tirosina</i>
<b>KIR</b>	<i>Receptores das células NK semelhantes a imunoglobulinas</i>
<b>KIV</b>	<i>Kaigang de Ivaí</i>
<b>KRC</b>	<i>Kaigang de Rio das Cobras</i>
<b>LRC</b>	<i>Complexo dos receptores leucocitários</i>
<b>MHC</b>	<i>Complexo principal de histocompatibilidade</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killer, exterminadora natural</i>
<b>NKC</b>	<i>Complexo Natural Killer</i>
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>Ori-BR</b>	<i>Orinetais brasileiros</i>
<b>PCR</b>	<i>Reação em cadeia da polimerase</i>
<b>PF</b>	<i>Pênfigo foliáceo</i>
<b>PV</b>	<i>Pênfigo vulgar</i>
<b>SBT</b>	<i>Genotipagem baseada em sequenciamento</i>
<b>SNP</b>	<i>Polimorfismo de nucleotídeo único</i>
<b>SSOP</b>	<i>Oligonucleotídeo sonda de sequência específica</i>
<b>SSP</b>	<i>Oligonucleotídeo iniciador de sequência específica</i>
<b>TCR</b>	<i>Receptor de células T</i>
<b>TLR</b>	<i>Receptor semelhante a toll</i>

## 1. INTRODUÇÃO

As células NK (*natural killer*) são importantes tanto para a resposta imune inata como para a adaptativa. São reguladas por receptores de superfície, que reconhecem ligantes ativadores e inibidores, cujo conjunto de sinais modula a resposta citotóxica das NK. Dentre os receptores, estão os KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*), que reconhecem epítomos presentes nas moléculas HLA de classe I e são os receptores das NK que apresentam maior diversidade. Os genes *KIR* apresentam três níveis de diversidade: ausência e presença dos genes, polimorfismo alélico e diversidade haplotípica. São altamente polimórficos e, embora tenham sido vastamente estudados em populações mundiais, muito pouco se sabe acerca da diversidade alélica e haplotípica desse complexo.

O pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune da pele, caracterizada por autoanticorpos que reconhecem desmogleína 1 (Dsg-1), importante para adesão celular. A resposta imune contra desmogleína causa a perda de adesão no estrato mais superficial da pele, o que resulta em formação de bolhas. Devido à semelhança com a sensação de queimadura, essa doença também é conhecida como fogo selvagem. Endêmica no Brasil, apresenta incidência de 25-35 casos/milhão/ano, sendo um problema de saúde pública no país, altamente relacionada a más condições de vida e ambiente rural.

Nesse trabalho, será descrita a diversidade de genes *KIR* em diversas populações brasileiras de diferentes ancestralidades. Um dos genes, *KIR3DL2*, terá sua diversidade alélica investigada após a implementação de um método de genotipagem em alta resolução baseado em seqüenciamento de DNA genômico. Ainda, verificaremos se o polimorfismo de *KIR* interfere na susceptibilidade ao pênfigo foliáceo, apresentando hipóteses acerca das possíveis associações.

## 2. GENES KIR

### 2.1 A CÉLULA EXTERMINADORA NATURAL

As células NK (*natural killer*, exterminadoras naturais) são linfócitos derivados da medula óssea, que quando são ativadas, podem produzir altos níveis de citocinas e quimiocinas. São encontradas no sangue periférico (correspondendo a aproximadamente 15% dos glóbulos brancos), podendo ser também verificadas em vários tecidos como placenta, fígado e cavidade peritoneal. Têm fundamental importância para a primeira linha de defesa do organismo (imunidade inata) contra infecções virais, células neoplásicas ou alteradas (BIRON e BROSSAY, 2001; BIRON *et al.*, 1999). Desde que foram identificadas em 1975 (KIESSLING *et al.*, 1975), a importância dessas células no combate a infecções virais foi demonstrada e baixos níveis de citotoxicidade de NK foram associados a infecções graves de vírus da herpes (CHING e LOPEZ, 1979), Epstein-Barr (JONCAS *et al.*, 1989) e citomegalovírus (QUINNAN *et al.*, 1982). Implicações em várias outras doenças virais, como influenza, HIV entre outras, já foram descritas. Apesar de compartilhar certas características com as células T, as NK podem ser facilmente identificadas pelo ataque precoce, a indução direta da lise celular e sua morfologia grande e granular. Também não apresentam receptores antigênicos de células T (TCR) e são CD3<sup>-</sup> (TRINCHIERI, 1989). Células NK provenientes de roedores e humanos compartilham muitas funções e características, mas diferem na expressão de seus receptores de superfície (BIRON e BROSSAY, 2001; BIRON *et al.*, 1999).

### 2.2 NK EM AÇÃO

Os linfócitos NK são ativados por citocinas pró-inflamatórias como interferons do tipo I (INFs) e interleucina-12 (IL-12) (WARREN, 1996); ou ainda, por dinucleotídeos citosina-guanina não metilados de origem bacteriana (BALLAS *et al.*, 1996). Essa ativação acentua a citotoxicidade das NK e a produção de citocinas. As células NK utilizam vários mecanismos indutores de apoptose, como perforinas, granzimas e fatores de necrose tumoral (TNF), para lisar as células alvo de maneira rápida e precisa (FLODSTRÖM *et al.*, 2002).

As moléculas HLA de classe I clássicas (HLA-A, HLA-B e HLA-C) são expressas na superfície da maioria das células e são reconhecidas por pelo menos dois tipos celulares distintos: linfócitos T citotóxicos (CTL) e células NK. Durante uma infecção viral, as moléculas de classe I apresentam peptídeos virais às células T, que reconhecem o complexo

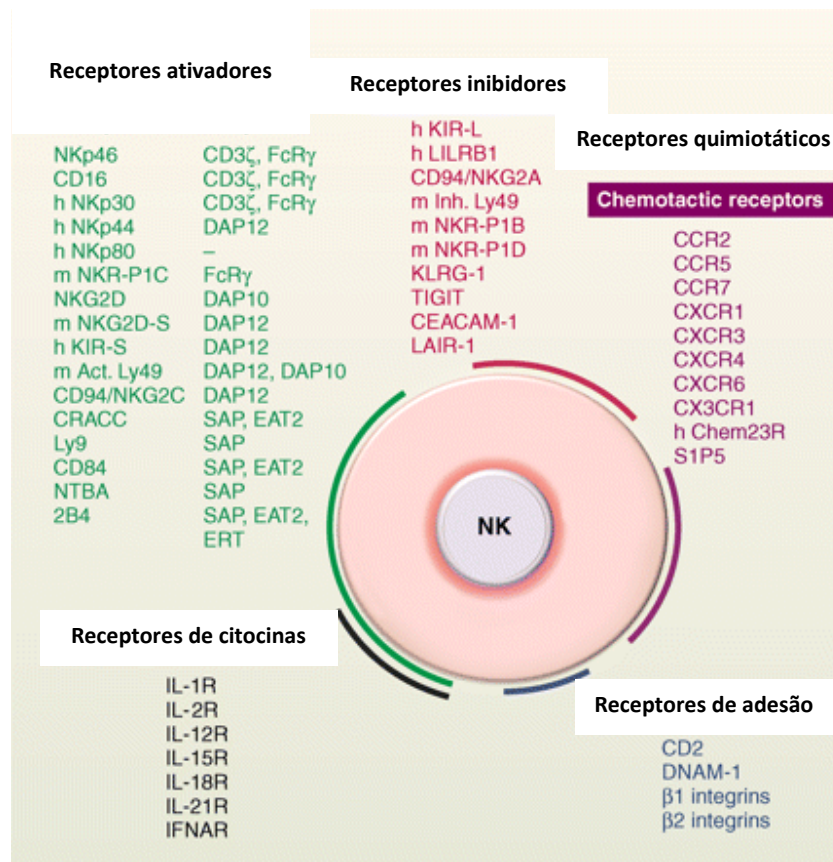
HLA/peptídeo através de receptores específicos (TCR). Na presença de sinais coestimuladores, é desencadeada uma série de sinais que resultam na ativação dos CTLs, que exterminarão as células infectadas (ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1974). Já as células NK possuem receptores ativadores e inibidores que, em conjunto, modulam sua ação exterminadora. Este mecanismo será mais bem explicado a seguir.

### 2.3 RECEPTORES DAS NK E A LICENÇA PARA MATAR

Existem diversos receptores de células NK. Receptores ativadores são aqueles que reconhecem ligantes solúveis, como citocinas, ou interagem com moléculas de superfície celular. Os ligantes inibidores agem basicamente impedindo a ação das NK, sendo a inibição mediada pelo reconhecimento de moléculas MHC próprias (será detalhado adiante). Além dos conhecidos receptores ativadores e inibidores, existem também receptores de citocinas, quimiotáticos e de adesão (FIGURA 1). Quando há predomínio de sinais inibidores, a célula NK não é dirigida ao ataque; o predomínio de sinais ativadores, por outro lado, estimula a célula NK a iniciar a lise da célula alvo (revisado por VIVIER *et al.*, 2011).

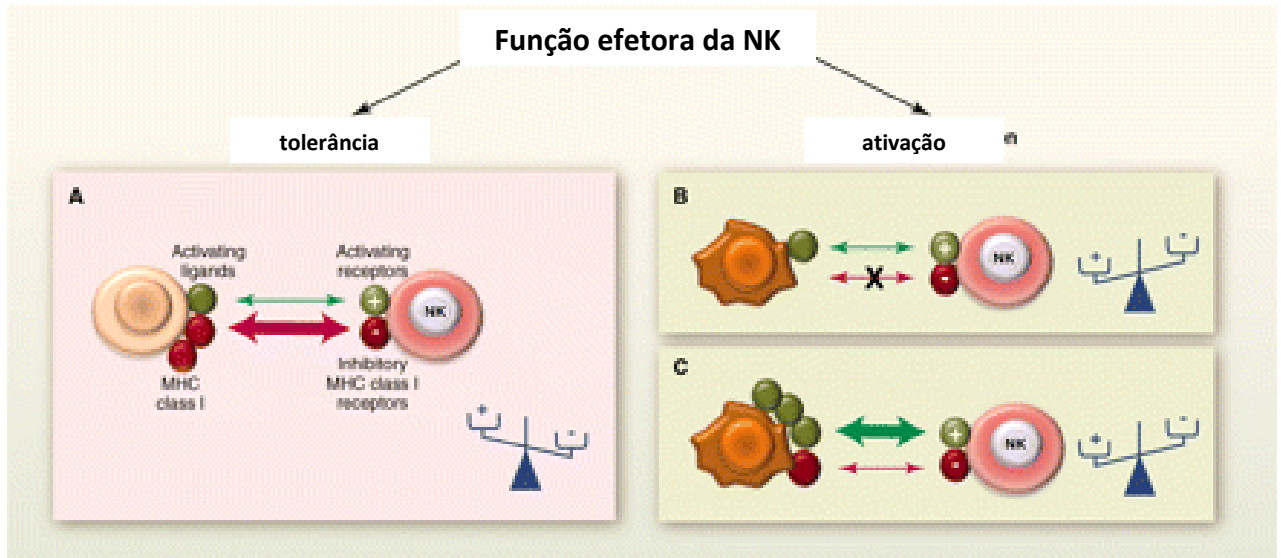
### 2.4 REGULAÇÃO DO ATAQUE DAS NK

Em 1986, Kärre e colaboradores demonstraram que as células NK podem detectar a falta ou baixa expressão de moléculas MHC classe I próprias, situação que ocorre quando a célula está infectada ou transformada por neoplasia. Esse modelo, chamado “*missing self*”, foi explicado pela ação conjunta de receptores semelhantes a imunoglobulinas em primatas – *KIR* (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*) e por receptores semelhantes a lectinas presentes em roedores – LY49 e o heterodímero CD94/NKG2A, em ambos (KARLHOFFER *et al.*, 1992; MORETTA *et al.*, 1996). Portanto, as células NK, através de receptores inibidores, reconhecem a baixa expressão de moléculas próprias (sinal de anormalidade) ou através de receptores ativadores, a expressão acentuada de moléculas que induzidas pelo stress/anormalidade celular. Dependendo do balanço entre sinais inibidores e ativadores, acontece ou não o ataque à célula alvo (RAULET e GUERRA, 2009). Esse mecanismo pode ser mais bem compreendido através da FIGURA 2.



Fonte: VIVIER *et al.*, 2011

**Figura 1** Receptores das células NK.



Fonte: VIVIER *et al.*, 2011

**Figura 2** Balanço de sinais ativadores e inibidores no controle da ativação das NK.

(A) Quando os sinais inibidores preponderam sobre os ativadores, a célula não é ativada (tolerância). (B) A ausência de sinais inibidores permite que sinais ativadores levem ao ataque pela célula NK. (C) De maneira semelhante, se o conjunto de sinais ativadores for mais forte que o de sinais inibidores, a célula NK será ativada.

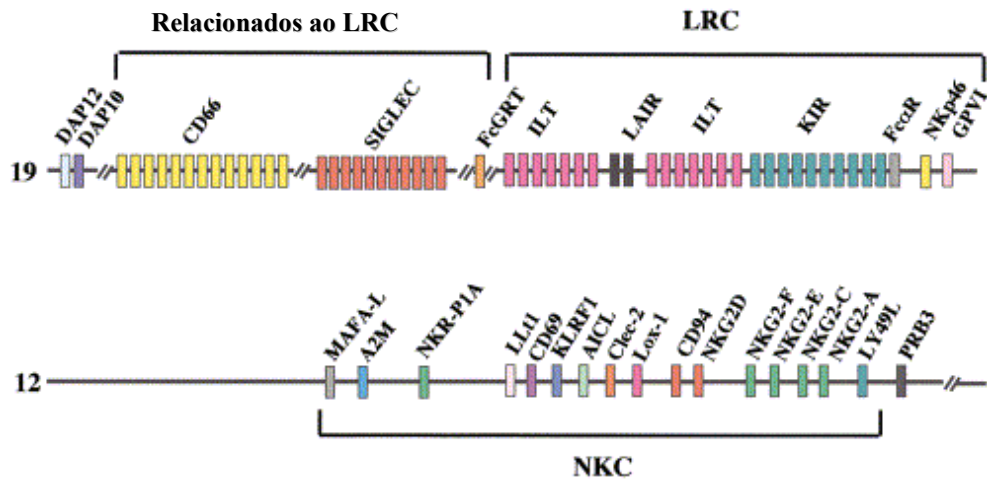


## 2.5 DOIS AGRUPAMENTOS DE GENES DOS RECEPTORES CODIFICAM GRANDE PARTE DOS RECEPTORES DAS NK

Os genes que codificam os receptores das células NK estão agrupados principalmente em dois cromossomos distintos (FIGURA 3). No cromossomo 12 estão localizados os genes *CD94* e *NKG2*, que codificam receptores semelhantes à lectina tipo C e estão presentes em uma região de aproximadamente 2 Mb na região genômica 12p13.1, no *Natural Killer Complex* (NKC) (BROWN *et al.*, 2001). No cromossomo 19, na região 19q13.4, está o *Leukocyte Receptor Complex* (LRC) que compreende mais de 25 genes oriundos de seguidas duplicações (WILSON *et al.*, 2000) pertencentes à superfamília das imunoglobulinas. A detecção dos alvos celulares pelas células NK é mediada por receptores pertencentes a duas superfamílias: os receptores semelhantes à imunoglobulina (*IgSF*) e os receptores semelhantes à lectina tipo C. Ambos podem contribuir com sinais inibidores e/ou ativadores. A função efetora desses receptores é controlada por sequências em caudas citoplasmáticas e na porção transmembrana (VÉLY e VIVIER, 1997). Moléculas com função inibidora possuem motivos inibidores baseados em tirosina – ITIMs (LONG, 1999) – e as moléculas com potencial ativador apresentam motivos ativadores baseados em tirosina – ITAMs (ISAKOV, 1998).

## 2.6 RECEPTORES SEMELHANTES A IMUNOGLOBULINAS – KIR

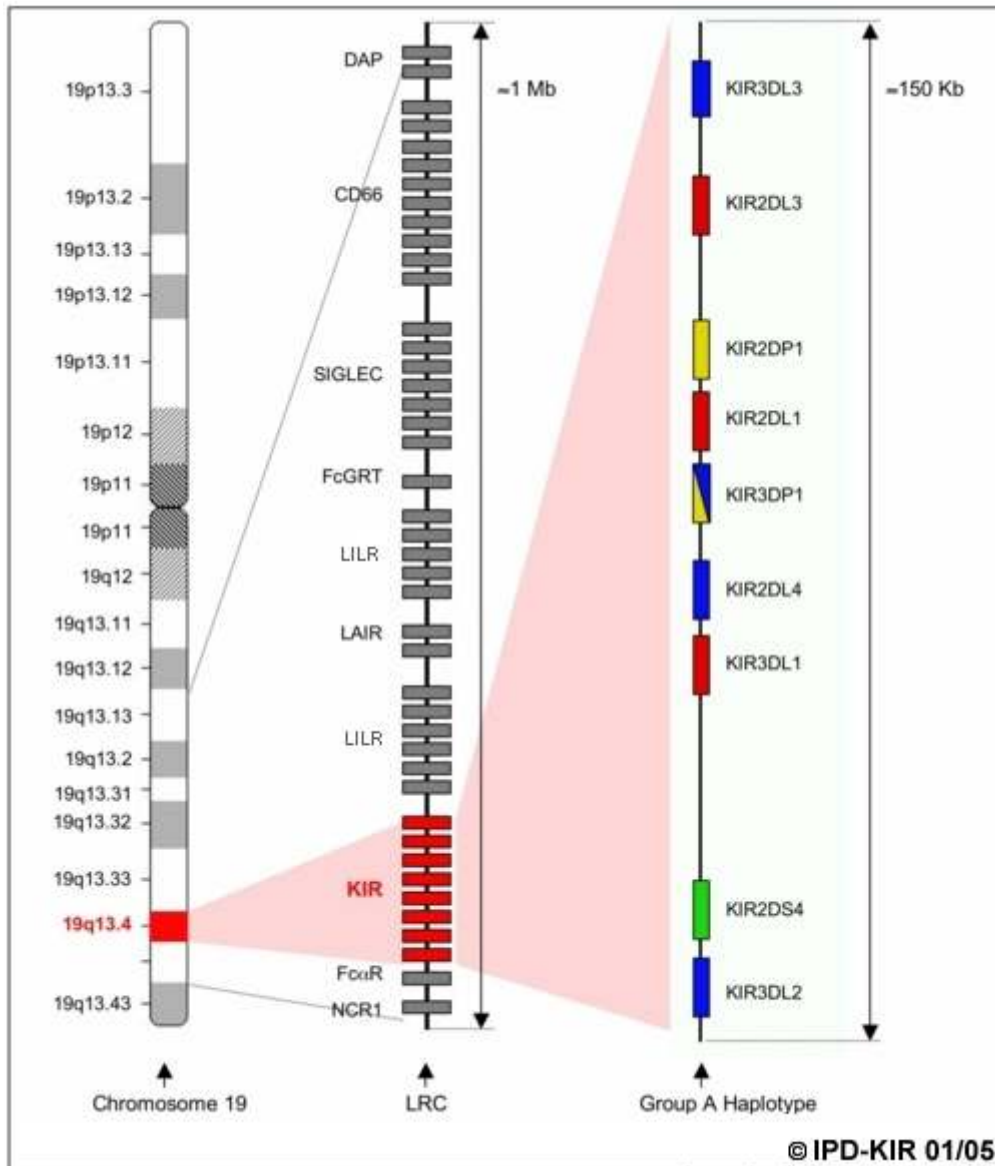
Os receptores KIR foram primeiramente descritos por MORETTA *et al.* (1993). Existem 14 genes *KIR* e dois pseudogenes, localizados no complexo de receptores leucocitários (LRC), na região genômica 19q13.4. Devido à grande semelhança entre os receptores, é difícil distinguir sorologicamente quais receptores estão expressos nas NK. No entanto, para alguns receptores, especialmente *KIR3DS1*, o estudo da diversidade alélica pode ser relacionado a padrões para identificação sorológica (GARDINER *et al.*, 2001). O LRC é uma região grande, de aproximadamente 1 Mb, densa e com famílias de genes que evoluem rapidamente (KHAKOO *et al.*, 2000). Além do agrupamento *KIR*, que corresponde a 150 Kb, podem ser encontrados no LRC os genes *DAP*, *CD66*, *SIGLEC*, *FcGRT*, *liLR*, *LAIR*, *FcGammaR* e *NCR1* (FIGURA 4).



FONTE: TROWSDALE *et al.* (2001)

**Figura 3 Organização dos agrupamentos de genes localizados nos cromossomos 19 (LRC) e 12 (NKC), que codificam receptores de células NK.**

A figura não está em escala.



Fonte: IPD (ROBINSON *et al.*, 2010)

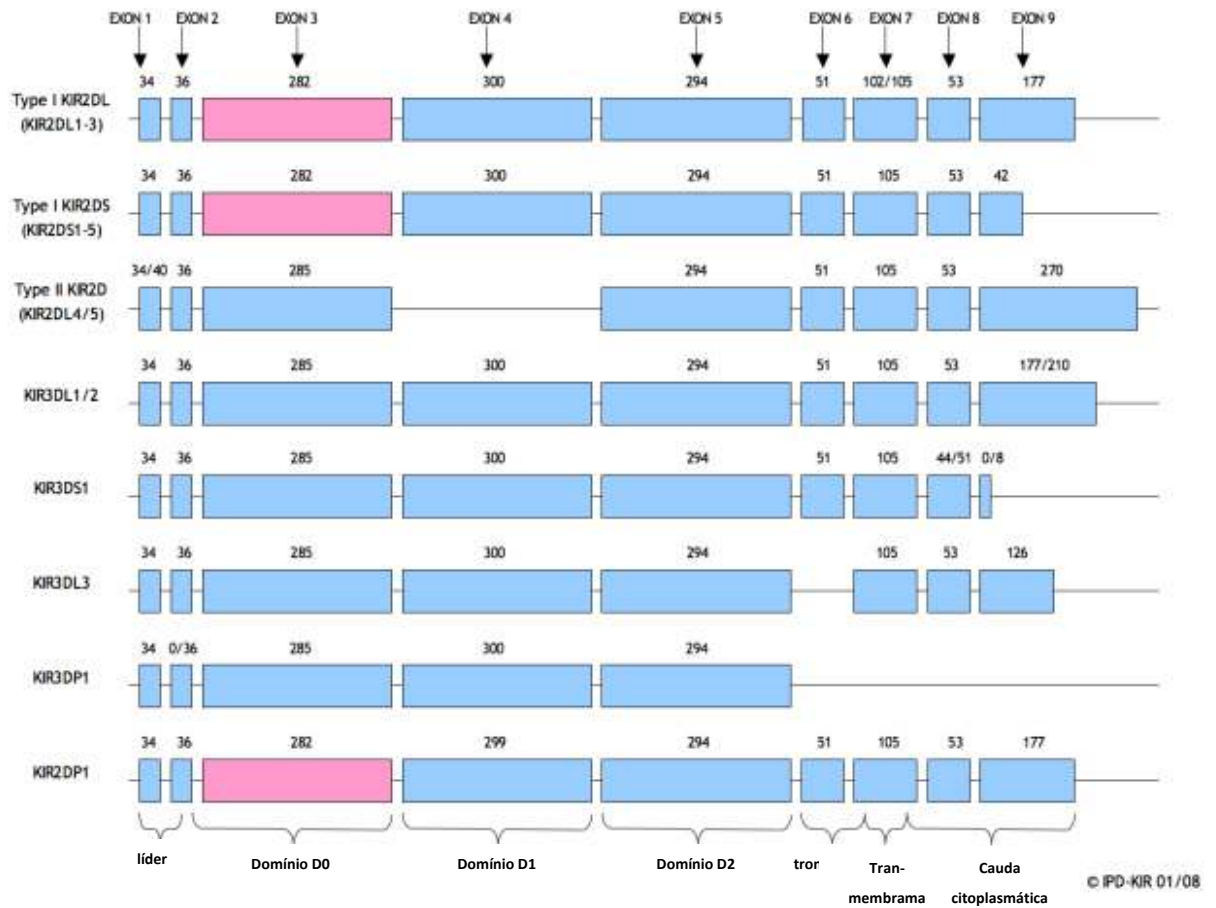
**Figura 4** Localização cromossômica e representação esquemática da organização das famílias gênicas do LRC.

Os genes *KIR* variam em tamanho (4 a 16 Kb) e em número de exons (4 a 9). São divididos em três grupos, de acordo com as estruturas apresentadas. Os genes do tipo 1, *KIR2D*, codificam dois domínios extracelulares proteicos do tipo D1 e D2. Fazem parte desse grupo os genes *KIR2DL1-3* e *KIR2DS1-5* além do pseudogene *KIR2DP1*. Genes do tipo 2, também *KIR2D*, diferentemente apresentam os domínios extracelulares D0 e D2. A este grupo pertencem os genes *KIR2DL4* e *KIR2DL5*. Finalmente, os genes tipo 3, os *KIR3D*, apresentam os três domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulina, D0, D1 e D2, sendo representados por *KIR3DL1-3*, *KIR3DS1* e o pseudogene *KIR3P1* (revisado por VILCHES e PARHAM, 2002). A FIGURA 5 mostra a organização dos exons e introns dos genes *KIR*.

A nomenclatura dos genes *KIR* (LONG *et al.*, 1996) é baseada, portanto, no número de domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina (dois ou três) e no tamanho da cauda citoplasmática, sendo L para caudas longas (do inglês, *long*) e S para caudas curtas (do inglês, *short*) dos produtos protéicos por eles codificados (FIGURA 6). De modo geral, moléculas *KIR* que possuem caudas longas promovem sinais inibidores enquanto os receptores de caudas curtas promovem sinais ativadores (PARHAM, 2005). *KIR2DL4* excepcionalmente promove ambos os sinais, inibidor e ativador (KIKUCHI-MAKI *et al.*, 2003). A diversidade alélica foi observada para a maioria dos genes *KIR* e os nomes dos alelos são baseados na nomenclatura utilizada para locos *HLA*. Para facilitar, vários autores referem-se a esses genes sem escrever o prefixo *KIR* (ex. *2DL1* ao invés de *KIR2DL1*). Essa notação também será adotada nesse trabalho a partir desse momento.

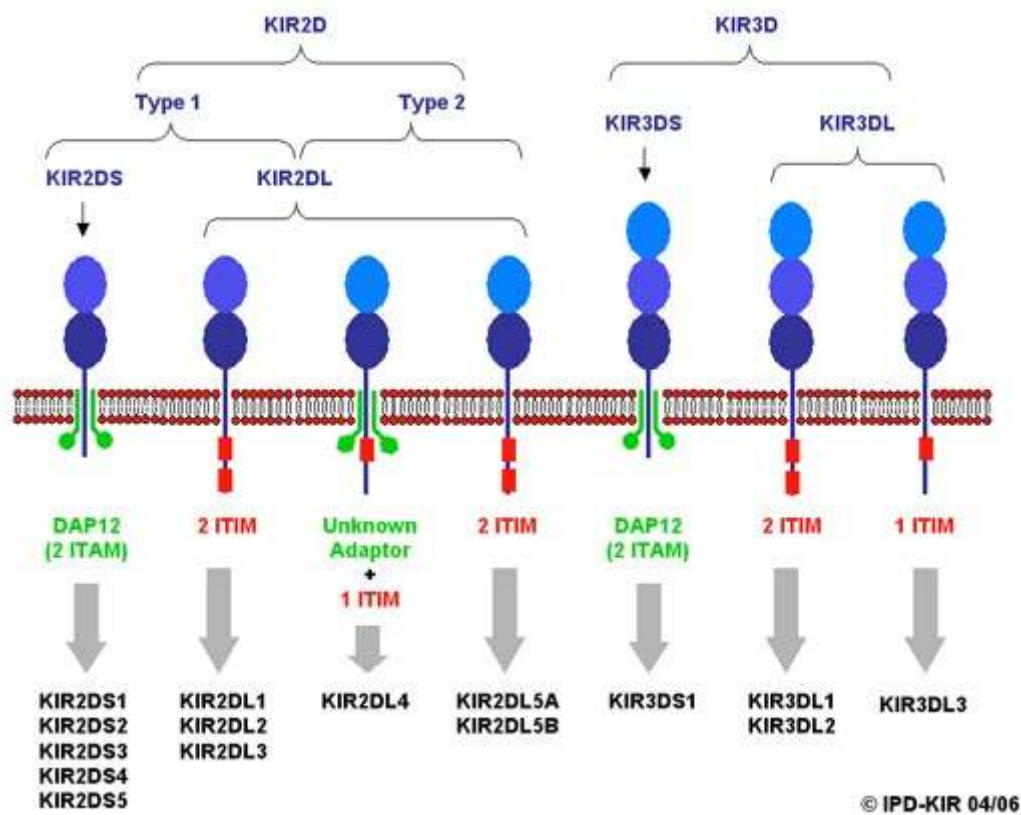
A função efetora desses receptores é controlada por sequências em caudas citoplasmáticas e na porção transmembrana (VÉLY e VIVIER, 1997). Moléculas com função inibidora possuem motivos inibidores baseados em tirosina – ITIMs (LONG 1999) – e as moléculas com potencial ativador apresentam motivos ativadores baseados em tirosina – ITAMs (ISAKOV, 1998).

A expressão de *KIR* não é idêntica em todas as células (FIGURA 7). Cada NK pode expressar um conjunto diferente de receptores, inicialmente selecionados ao acaso (RAULET, D H *et al.*, 2001). Dessa forma, nem todas as células NK apresentam o mesmo conjunto de receptores e podem estar relacionadas a certos locais ou tecidos específicos ou a uma maior ou menor resposta contra um patógeno.



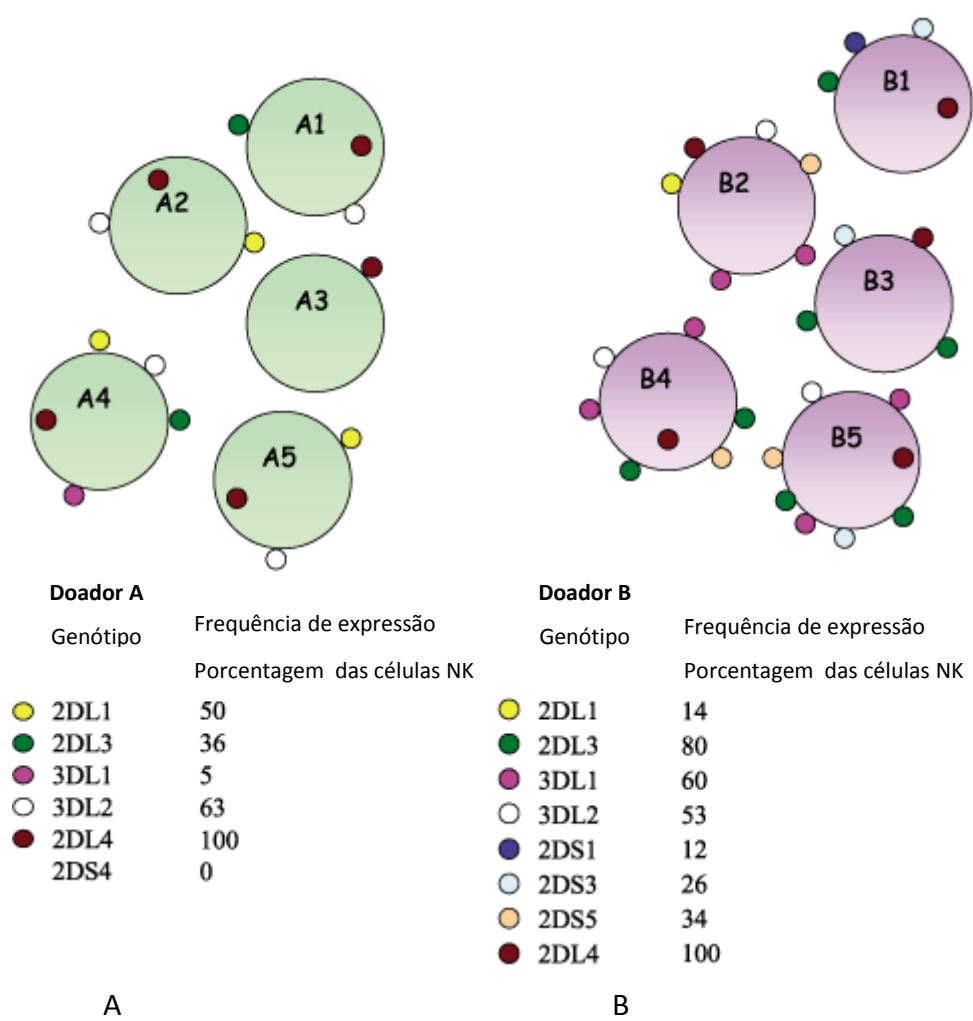
Fonte: IPD (ROBINSON *et al.*, 2010)

**Figura 5** Organização interna dos genes *KIR* e correspondência entre os exons e os domínios proteicos.



Fonte: IPD (ROBINSON *et al.*, 2010)

Figura 6 Representação esquemática da estrutura das moléculas KIR



Fonte: VIVIER *et al.*, 2011

**Figura 7** Diferentes clones de células NK de um mesmo indivíduo expressam subconjuntos parcialmente sobrepostos de KIR.

## 2.7 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *KIR*

O complexo *KIR* apresenta três níveis de diversidade: polimorfismo de ausência e presença, diversidade haplotípica e polimorfismo alélico. Essa diversidade incomum faz com que a forma de mencionar esses genes difira entre autores. *3DL1* e *3DS1*, por exemplo, são considerados genes diferentes por alguns autores e, alelos do mesmo gene, por outros.

Genes *KIR* são homólogos e bastante semelhantes em sequência, situados em um segmento de DNA que foi submetido à expansão e contração ao longo de uma evolução rápida. Estudos sobre haplótipos sugerem uma história de duplicação gênica e permuta desigual na região (MARTIN *et al.*, 2003). Tema de debates em diversas conferências internacionais, a padronização da terminologia a ser usada para esse grupo gênico ainda não é consensual. Para evitar maior confusão, uma das medidas adotadas foi a produção do banco de dados on-line IPD-KIR (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir> - ROBINSON *et al.*, 2010) que além de informação detalhada, apresenta ferramentas para alinhamentos de nucleotídeos e aminoácidos, nomenclatura, alelos, entre outras ferramentas.

O polimorfismo de ausência e presença, pouco comum para a maioria dos genes humanos, permite que os haplótipos *KIR* diferenciem-se em tamanho e, obviamente, conteúdo gênico, de forma que pessoas diferentes podem apresentar número de genes diferentes. Ainda, cada gene apresenta diversidade alélica. Esses componentes de diversidade, aliados à elevada heterozigosidade em populações, fazem com que seja praticamente impossível achar duas pessoas não relacionadas geneticamente que apresentem o mesmo genótipo *KIR*.

## 2.8 DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA

Os haplótipos *KIR* são flanqueados na sua porção terminal centromérica pelo gene *3DL3* e na região telomética por *3DL2*; no centro, encontram-se *3DP1* e *2DL4*. Esses quatro, chamados de genes moldura, estão presentes em virtualmente todos os haplótipos (VILCHES e PARHAM, 2002; WILSON *et al.*, 2000). Estudos de segregação em família, como os desenvolvidos por UHRBERG *et al.* (2002), foram essenciais para a descrição de muitos dos haplótipos descritos.

Os haplótipos dos genes *KIR* foram separados em dois haplogrupos, A e B. O haplogrupo A é composto por um único tipo de haplótipo no que se refere a conteúdo gênico, ou seja, presença/ausência de determinados genes. É normalmente constituído por

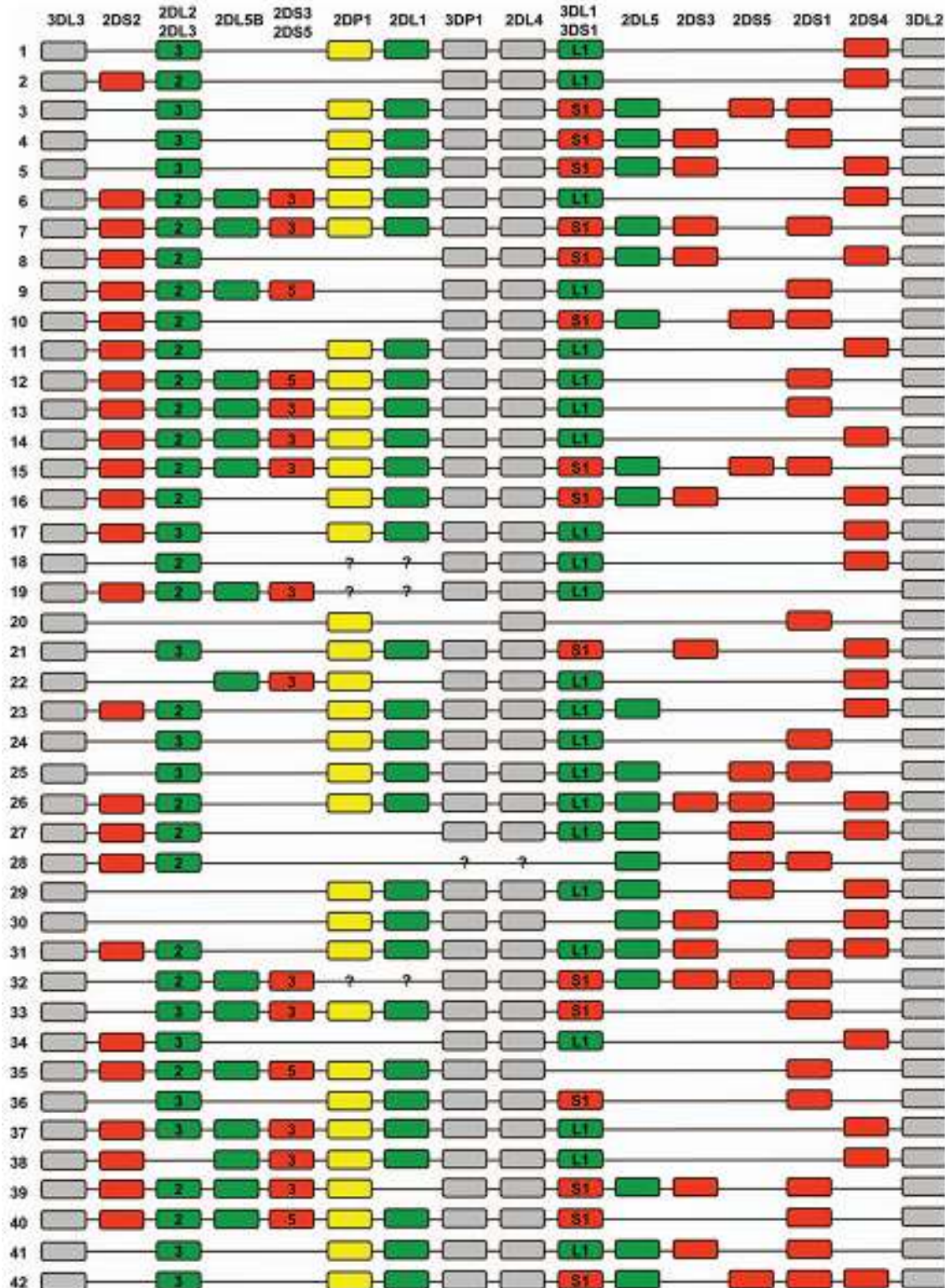


sete genes, embora já tenham sido descritos haplótipos desse grupo com apenas cinco ou seis genes. Contrariamente, o haplogrupo B contém centenas de haplótipos que diferem quanto ao conteúdo gênico, variando de sete a onze genes. Mesmo com uma quantidade muito maior de haplótipos B, o haplogrupo A é o mais comum na maioria das populações estudadas (UHRBERG *et al.*, 1997; UHRBERG *et al.*, 2002).

A diferença mais relevante entre esses dois haplogrupos, que traz implicações funcionais no reconhecimento das NK, é o número de genes que codificam receptores ativadores. O haplogrupo A contém um único gene *KIR* ativador clássico, *2DS4*, além de *2DL4* que é um gene moldura que promove sinais inibidores e ativadores. Já o haplogrupo B contém uma variedade de combinações de *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5*, *3DS1*, *2DS4*, além de *2DL4*. Entretanto, o gene ativador do haplogrupo A, *2DS4*, possui um grupo de alelos não funcionais de alta frequência (MAXWELL *et al.*, 2002; AUGUSTO *et al.*, 2012). Do mesmo modo, *2DL4* possui um grande número de alelos não funcionais causados por deleções que alteram a matriz de leitura (YAWATA *et al.*, 2006). Por causa da alta frequência do haplogrupo A em populações e também os frequentes alelos não funcionais de *2DS4* e *2DL4*, um grande número de indivíduos não possuem *KIR* ativador funcional.

As frequências dos haplogrupos A e B variam muito de uma população para outra. Já foram registradas frequências do haplogrupo A de 75% em japoneses, 58% em euro-descendentes, mas de apenas 15% em aborígenes australianos (PARHAM, 2005; TONEVA *et al.*, 2001; YAWATA *et al.*, 2002). A maior diversidade haplotípica intra-populacional foi registrada em populações sul-asiáticas (NORMAN *et al.*, 2002; RAJALINGAM *et al.*, 2002) e a menor em japoneses (YAWATA *et al.*, 2002). Os haplótipos mais frequentes descritos em estudos anteriores estão listados na FIGURA 8.

Muito do que se sabe a respeito dos haplótipos se deve a estudos realizados sobre perfis de genótipos *KIR*, ou seja, pela presença ou ausência de genes em indivíduos não aparentados. Alguns pares de genes do haplogrupo B apresentam um desequilíbrio de ligação muito forte, o que pode possibilitar a identificação dos haplótipos (UHRBERG *et al.*, 1997). O conjunto de genes que cada indivíduo apresenta é chamado de perfil. Mais de 430 perfis quanto à presença/ausência dos genes *KIR* já foram descritos, em mais de 12 mil indivíduos estudados, de mais de 190 amostras de populações mundiais ([www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net) – GONZALEZ-GALARZA *et al.*, 2011) e o número continua aumentando à medida que mais estudos populacionais são realizados.



Fonte: KHAKOO e CARRINGTON, 2006

**Figura 8** Lista de haplótipos KIR

Esses haplótipos foram confirmados em estudos de segregação em famílias. O primeiro haplótipo representa o haplogrupo A, enquanto os demais pertencem ao haplogrupo B.

Expansão e contração da região *KIR* parecem ter ocorrido devido, principalmente, à permuta desigual. Como consequência desse evento genético, é possível a ocorrência de haplótipos que possuem duas ou mais cópias de um gene e um rearranjo na ordem dos locos. *2DL5* é o gene identificado mais recentemente (VILCHES *et al.*, 2000) e análises de segregação mostraram que de fato há dois locos *2DL5* (*2DL5A* e *2DL5B*) que podem estar concomitantemente no mesmo haplótipo (FIGURA 8) (GÓMEZ-LOZANO *et al.*, 2002). Haplótipos contendo múltiplas cópias de um mesmo gene aumentam ainda mais a diversidade haplotípica de *KIR*. Compreender essa diversidade em populações é importante para elucidar variações de susceptibilidade e resistência a doenças, além de contribuir para reconstruir a história biológica de populações humanas.

## 2.9 DIVERSIDADE ALÉLICA

O polialelismo é mais um fator que contribui para a diversidade de *KIR*, mesmo para aqueles indivíduos que possuem haplótipos que não diferem quanto ao conteúdo gênico. Devido à similaridade entre os genes dos receptores da superfamília das imunoglobulinas e a história evolutiva de permuta desigual, foi sugerido que diferentes genes podem ocupar o mesmo loco. Havia sido sugerido que os genes *2DS4* e *2DS1* segregavam como alelos de um mesmo loco (UHRBERG, M *et al.*, 1997), no entanto, dados mais recentes revelaram que eles estão em locos diferentes em desequilíbrio de ligação negativo. Os genes *3DL1* e *3DS1* parecem ocupar a mesma região genômica em diferentes haplótipos (WILSON *et al.*, 2000) e estudos de segregação indicam que eles são alelos de um mesmo loco (GARDINER *et al.*, 2001). Entretanto, já foram descritos haplótipos raros em que ocorre a ausência ou presença de ambos (CRUM *et al.*, 2000; GARDINER *et al.*, 2001) que podem ter sido formados por permuta desigual subsequentes à formação do gene. Já foi sugerido por diversos estudos que os genes *2DL2* e *2DL3* também se comportam como alelos de um mesmo loco (CRUM *et al.*, 2000; NORMAN *et al.*, 2002; WITT *et al.*, 1999).

Até o momento, 614 alelos *KIR* já foram descritos (fonte: IPD-KIR ROBINSON *et al.*, 2010 acessado em 23/01/12 às 04:55 h). Os genes com quantidades maiores de alelos são *3DL3*, *3DL2*, *3DL1* e *2DL4* (TABELA 1).

Estudar a diversidade alélica é uma ferramenta importante para compreensão do complexo *KIR*. Além de fornecer informações sobre os haplótipos, a própria descrição da

diversidade intra- e interpopulacional é fundamental para fornecer subsídios para estudos evolutivos. Ainda, a diversidade alélica pode interferir na ligação receptor-ligante, como por exemplo, os alelos *2DL2/2DL3*, em que os receptores *2DL2* têm maior afinidade pelo ligante HLA-C do que *2DL3* (MOESTA *et al.*, 2008).

## 2.10 *KIR2DL4*

De todos os genes com dois domínios extracelulares, *2DL4* e *2DL5* diferenciam-se dos demais por terem os domínios D0 e D2 (ao contrário dos demais, que possuem D1 e D2) (Figura 05). Além disso, *2DL4* também é notável por ser aparentemente transcrito em todas as células NK (VALIANTE *et al.*, 1997). Outra característica de *2DL4* é a sua região promotora. Enquanto a média de similaridade entre os promotores *KIR* é superior a 91%, o que indica uma regulação semelhante, *2DL4* apresenta uma similaridade de apenas 69% (TROWSDALE *et al.*, 2001). A presença de apenas um domínio com motivo inibidor (todos os demais genes *2DL* apresentam dois) e a presença de uma arginina carregada positivamente na região transmembrana, não presente nos demais *2DL* (FIGURA 6), sugerem que *2DL4* promova tanto sinais inibidores como ativadores (FAURE e LONG, 2002; KIKUCHI-MAKI *et al.*, 2003; RAJAGOPALAN *et al.*, 2001). Foi sugerido que *2DL4* tenha como ligante a molécula *HLA-G* e que desempenhe um papel importante durante a gestação (RAJAGOPALAN e LONG, 1999). Entretanto, estudo posterior colocou em dúvida essa conclusão (BOYSON *et al.*, 2002).

Até o momento, são conhecidos 46 alelos de *2DL4*. Baseados em uma deleção de uma adenina na posição 811, dois grupos foram definidos, chamados de 9A (grupo de alelos que apresenta a deleção) e 10A (grupo sem a deleção) (MARTIN *et al.*, 2000). Esses grupos diferem de maneira acentuada quanto à expressão e função. Os alelos com deleção não podem expressar o receptor funcional devido à mudança de matriz de leitura, que leva a um códon de parada pela deleção de uma adenina (GOODRIDGE *et al.*, 2007; GOODRIDGE *et al.*, 2003). Essa deleção é comum em várias populações mundiais, tendo uma frequência de 57,6% na população de Curitiba (AUGUSTO *et al.*, 2012).

Alelos KIR								
Gene	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3
Alelos	43	28	34	46	41	15	22	14
Proteínas	24	11	17	22	17	7	8	5
Nulos	1	0	1	0	0	0	0	1

Gene	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
Alelos	30	16	73	16	84	107	22	23
Proteínas	13	11	58	12	61	55	0	0
Nulos	0	0	1	1	1	0	0	0

FONTE: <http://www.ebi.ac.uk/ipd>. Acesso dia 23/01/2012 às 4:55 h (ROBINSON, J. *et al.*, 2010).

**Tabela 1 Número de alelos e proteínas KIR**

### 2.11 *KIR3DL2*

Com 15 Kb, *3DL2* é o gene *KIR* mais longo, contendo nove exons. A molécula 3DL2, de 70 kDa, possui 3 domínios extracelulares e uma cauda citoplasmática longa, com dois motivos inibidores baseados em tirosina (VILCHES e PARHAM, 2002). Presente em virtualmente todos os haplótipos, 3DL2 parece reconhecer como ligante HLA-A3 e HLA-A11 (HANSASUTA *et al.*, 2004). Com 84 alelos, é o segundo gene mais polimórfico do complexo.

Quando funcionais, os receptores 2DS4 reconhecem HLA-C e também HLA-A11. De maneira interessante, 2DS4 e 3DL2 compartilham um motivo prolina-valina na posição 71-72. Esse motivo provavelmente foi introduzido em *2DS4* por conversão gênica, antes da separação entre as linhagens de chimpanzés e humanos e, foi proposto que esse evento de conversão gênica tenha capacitado 2DS4 ao reconhecimento de HLA-A11 (GRAEF *et al.*, 2009). Ainda em relação a *2DS4*, foi descrita uma deleção de 22 pb (HSU *et al.*, 2002) no exon 5 (códon 131 a 138). A deleção ocorre na região que codifica o segundo domínio semelhante à imunoglobulina da região extracelular e, com isso, há mudança no quadro de leitura, de forma que esse variante resulta em uma proteína não funcional. Devido à homologia do novo variante com o gene do receptor de NK presente em macacos (*Mm-KIR1D*) foi a ele sugerido o nome de *KIR1D* também em humanos. *KIR1D* apresenta frequência elevada em vários estudos populacionais já realizados (DENIS *et al.*, 2005; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2005; MAHFOUZ *et al.*, 2006) e também foi analisado na população de Curitiba, ocorrendo em 75% dos indivíduos (AUGUSTO *et al.*, 2012). No entanto, sabe-se hoje que *1D* consiste de um grupo de pelo menos quatorze alelos (ROBINSON, J. *et al.*, 2010).

Recentemente, uma nova função foi descrita para 3DL2. Foi demonstrado que o domínio D0 desse receptor reconhece oligodeoxinucleotídeos CpG de origem microbiana, enviando-os através de endossomos até os receptores TLR (*toll-like receptors*; SIVORI *et al.*, 2010). Essa nova função parece ser característica de todos os genes que possuem o domínio D0, trazendo novas perspectivas a respeito das funções de KIR.

A expressão de 3DL2 é utilizada para distinção entre síndrome de Sézary e outras doenças eritrodérmicas benignas, doenças que dificilmente são diferenciadas devido a não especificidade de resultados histomorfológicos. Transcritos de CD158/3DL2 em biópsias de pele são marcadores únicos para diagnóstico da síndrome de Sézary (ORTONNE *et al.*, 2008), facilitando também o tratamento. A diversidade alélica desse receptor já foi associada à

susceptibilidade a pré-eclampsia (WANG, X.-L. *et al.*, 2011). Entretanto, nenhum trabalho foi realizado até o momento para investigar se o polimorfismo alélico de *3DL2* e combinações com os possíveis ligantes HLA-A3 e HLA-A11 influenciam a resistência ou susceptibilidade a doenças infecciosas ou autoimunes.

## 2.12 IMUNOGENÉTICA DAS NK

Se ocorrer diminuição da expressão de moléculas MHC de classe I, que são ligantes de KIR, o sinal inibidor é eliminado, e a célula NK pode ser ativada, causando a morte da célula infectada ou transformada. Esse modelo é conhecido como “*missing-self*” (falta do próprio), pois as células exterminadoras naturais agem quando não reconhecem as moléculas que conferem a identidade da célula. Diferentemente, os linfócitos T geralmente agem pelo reconhecimento de moléculas alteradas (do inglês *altered-self*). Consequentemente, todas as células NK possuem pelo menos um receptor inibidor para o reconhecimento das células do próprio organismo (LJUNGGREN *et al.*, 1991; VALIANTE e PARHAM, 1997).

Uma alorreação ocorre quando as moléculas HLA das células alogênicas não incluem os ligantes inibidores das células NK. Esse fenômeno pode ser ilustrado com receptores KIR específicos para HLA-C. Moléculas HLA-C possuem um polimorfismo na posição 80 da sequência de aminoácidos, que determina dois grupos distintos de ligantes inibidores. Ligantes HLA-C com lisina na posição 80 (HLA-C1) são reconhecidos por 2DL2 e 2DL3 enquanto as moléculas HLA-C com uma asparagina na posição 80 (HLA-C2) são reconhecidos por 2DL1. Uma pessoa que possui os dois tipos distintos de HLA-C apresenta um conjunto de células NK que é inibido pelas moléculas HLA-C com lisina e outro conjunto de células que é inibido por HLA-C com asparagina na posição 80. Nesse caso, suas células NK causarão lise das células de quaisquer pessoas que sejam homozigotas para asparagina 80 ou lisina 80, já que as células do homozigoto para lisina 80 serão lisadas pelo conjunto de células que não terão seu receptor 2DL1 inibido e as células de homozigotos para asparagina 80 serão eliminadas pelas NK que não terão seus receptores 2DL2 e 2DL3 inibidos (KÄRRE, 2002). Esse tipo de reação pode ajudar aos pacientes de leucemia que recebem transplantes de medula óssea, uma vez que as células neoplásicas, caso sobrevivam à intensa radioterapia e

quimioterapia, serão eliminadas pelas células NK transplantadas. Dessa forma há uma diminuição drástica na chance de reincidência da doença (PARHAM e MCQUEEN, 2003).

Os receptores ativadores já foram associados a muitas doenças. Estudos mostram que os genes 2DS1 e 2DS2 conferem susceptibilidade à artrite psoriática caso haja ausência de ligantes HLA-C para os receptores inibidores 2DL1 e/ou 2DL2/3 (MARTIN *et al.*, 2002). A presença do gene 2DS1, em conjunto com a ausência dos ligantes dos genes 2DL2 e 2DL3, está associada a uma pior recuperação de pacientes de leucemia mielóide tratados com transplante de medula óssea (COOK *et al.*, 2004). A diabetes tipo 1 foi associada ao aumento de genes *KIR* ativadores em conjunto com a combinação de 2DS2 e a presença de HLA-C asparagina 80 (van der SLIK *et al.*, 2003). De forma semelhante, a combinação entre 2DS2 e HLA-C asparagina 80 estão associados à vasculite, ocorrendo como complicação da artrite reumatóide (YEN *et al.*, 2001). No entanto, é importante ressaltar que essas associações de doenças com genes ativadores podem ser decorrentes de desequilíbrio de ligação com outros locos. Dessa forma, ainda permanecem desconhecidos os motivos que levam células NK, responsáveis principalmente pela defesa inata do organismo, a estarem associadas a doenças autoimunes.

Outros ligantes de KIR já foram descritos. KIR3DL1/S1 reconhecem epítomos Bw4, que são codificadas tanto por HLA-A quanto por HLA-B, sendo que as moléculas Bw4(80I) são reconhecidas mais fortemente (CARR *et al.*, 2005; CELLA *et al.*, 1994). Alótipos HLA-A3 e A11 parecem ser reconhecidas por 3DL2 (HANSASUTA *et al.*, 2004), mas evidências mais concretas ainda não foram publicadas. Mais detalhes sobre ligantes de KIR são descritos na introdução do manuscrito "*Activating KIR and their HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering disease of skin*", parte integrante desta tese.



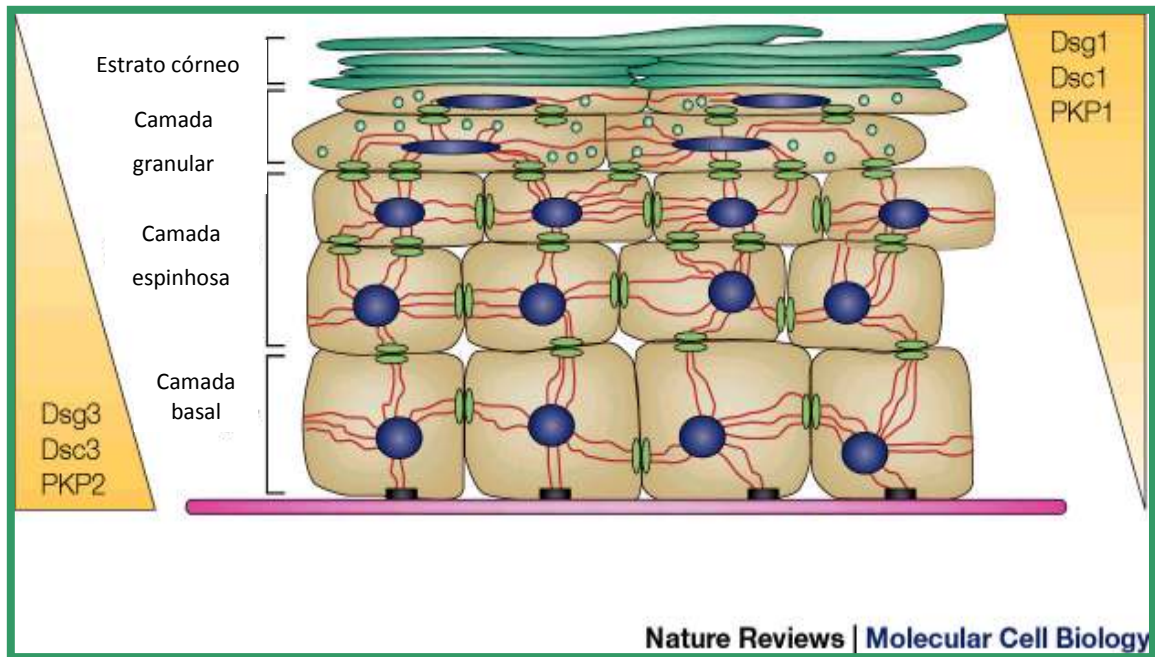
### 3. PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO: UMA DOENÇA DA EPIDERME

#### 3.1 ASPÉCTOS GERAIS E HISTÓRICOS

Pênfigo é um grupo de doenças autoimunes da pele e mucosas, cuja principal característica é a formação de bolhas que se rompem facilmente, deixando a pele lesionada e avermelhada, posteriormente recoberta por escamas e formação de crostas. Há pelo menos duas formas de pênfigo – pênfigo foliáceo (PF), pênfigo vulgar (PV) – e o alvo dos autoanticorpos são glicoproteínas de superfície denominadas desmogleínas (Dsgs), pertencentes à família das caderinas e sintetizada por queratinócitos. Essas glicoproteínas participam da adesão celular e estão presentes em regiões diferentes: a Dsg 1 é restrita à camada superior (subcórnea) do tecido epitelial e é alvo de autoanticorpos causadores do PF; já a Dsg 3 está presente na camada suprabasal e também nas mucosas e é alvo dos autoanticorpos causadores do PV (FIGURA 9) (ANHALT, 1999). Lesões típicas de pênfigo são mostradas na FIGURA 10.

Há duas formas de pênfigo foliáceo, a forma esporádica, descrita pela primeira vez em Paris, em 1844, rara e esparsamente distribuída no mundo; também a forma endêmica, específicas de certas regiões do Brasil, Colômbia, México e Tunísia, conhecida como fogo selvagem, registrado no Brasil pela primeira vez em 1903. A única diferença entre essas duas formas é a distribuição geográfica, uma vez que não há diferenças clínicas e histopatológicas. A maior incidência do PF é no Brasil, motivo pelo qual este já foi denominado pênfigo foliáceo brasileiro.

É interessante que PF manifesta-se normalmente em adultos jovens, de qualquer origem geográfica, trabalham em áreas rurais e de baixa renda e é comum em regiões entre 500 e 800m de altitude, sendo muito raro em regiões abaixo de 400m ou acima de 1000m, endêmico dos estados brasileiros de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (LOMBARDI *et al.*, 1992). Nesses estados, foram registrados mais de 15.000 casos até 1982.



**Figura 9 Esquema geral das camadas da pele.**

Desmogleína-1 une as células da camada mais superficial, enquanto desmogleína-3, a camada mais basal.



**Figura 10 Lesões de pênfigo vulgar e pênfigo foliáceo.**

A = lesões profundas típicas de pênfigo vulgar. A forma generalizada dessa doença é grave, podendo atingir a pele e todas as mucosas, o que pode levar a pessoa à morte devido ao risco de infecções e dificuldades na alimentação. B = lesões localizadas de pênfigo foliáceo. C = lesões generalizadas de pênfigo foliáceo, em estágio avançado de cicatrização.

O primeiro caso de PF no Brasil foi registrado por Aranha Campos, que descreveu dois casos que apareceram em Franca, interior do estado de São Paulo, na metade do século XIX (EATON *et al.*, 1998). O número de casos foi aumentando e, devido ao difícil tratamento e grande sofrimento dos pacientes, foram construídos hospitais específicos para o tratamento da doença, como o caso do Hospital Ademar de Barros em São Paulo, Hospital do Pênfigo de Goiânia em Goiás e o Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande, no Mato Grosso do Sul. Este último, o qual recebe o maior número de pacientes no Brasil, embora privado, faz tratamento gratuito aos pacientes de PF e tem uma parceria com o Laboratório de Genética Molecular Humana – UFPR ao longo de anos. Há também outros hospitais que se especializaram no tratamento de Fogo Selvagem, como em Uberaba, MG (LOMBARDI *et al.*, 1992). A epidemia do PF tem uma história que coincide com o desbravamento e ocupação do Brasil. A doença praticamente desapareceu dos focos em São Paulo e norte do Paraná desde a metade da década de 70, concentrando-se e estabilizando-se até os dias de hoje na região Centro-Oeste e Norte.

### 3.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO FOGO SELVAGEM E ETIOLOGIA

O fogo selvagem é uma doença autoimune órgão específica clássica que envolve a epiderme e autoanticorpos patogênicos. Sua lesão típica, a acantólise, consiste de dissolução, ou lise, das junções intercelulares do epitélio escamoso. As células epiteliais, sem as junções que as mantinham coesas umas às outras, perdem sua forma poliédrica tornando-se arredondadas. O espaço entre elas resulta na formação de uma bolha intraepidérmica. O soro de pacientes com pênfigo foliáceo contém autoanticorpos da classe imunoglobulina G (IgG).

Através da técnica de imunofluorescência direta para verificar as subclasses de anticorpos IgG presentes no soro de pacientes com pênfigo foliáceo, foi constatado que havia um depósito preferencial de IgG4 na superfície dos queratinócitos. Também foram observadas, em menor título IgG1 e IgG2 e ausência de IgG3. A transferência passiva de autoanticorpos da subclasse IgG4, em camundongos neonatos, reproduzia as mesmas características clínicas, histológicas e imunológicas do pênfigo. São formadas bolhas na epiderme, após a transferência de anticorpos obtidos de pacientes com PF endêmico, e bolhas profundas após a transferência de anticorpos extraídos de pacientes com PV,

estabelecendo que os anticorpos têm um importante papel na indução destas duas formas de doença (ANHALT, 1999; FUTAMURA *et al.*, 1989; ROSCOE *et al.*, 1985). Ainda permanece incerto o mecanismo responsável pela acantólise.

### 3.3 PÊNFIGO – UMA DOENÇA COMPLEXA

Como outras doenças multifatoriais, o pênfigo não tem uma única causa, seja ela ambiental ou genética. Nesse tipo de doença, vários fatores genéticos e ambientais interagem para o desencadeamento da enfermidade, mas com contribuições diferentes. Como outros exemplos de doenças complexas, ou multifatoriais, estão o câncer, lúpus eritematoso sistêmico, esquizofrenia, entre outras.

Pouco se sabe sobre a etiologia de doenças complexas, o que torna o tratamento difícil e pouco específico. Entender e identificar os fatores genéticos envolvidos nessas doenças podem auxiliar na busca de novas estratégias de tratamento além de contribuir para a compreensão da etiopatogênese, novos métodos de diagnóstico e prevenção. Estudos caso- controle têm sido utilizados para identificação de variantes genéticas que exercem pequeno efeito fenotípico. Esse tipo de análise requer amostras muito menores que análises de ligação, que necessitam de centenas de famílias (RISCH e MERIKANGAS, 1996).

### 3.4 A GENÉTICA E AMBIENTE NO CONTEXTO DO PÊNFIGO FOLIÁCEO

O PF é uma doença autoimune curiosamente endêmica, o que sugere influência de fatores ambientais. A maior incidência de casos em núcleos familiares também sugere envolvimento genético, sendo que o fato da doença ser multifatorial e complexa, não sugere um único ou poucos genes envolvidos.

LOMBARDI *et al.* (1992) encontraram evidências que sugerem que um mosquito da família Simuliidae (borrachudo, mosca negra) possa estar desencadeando a resposta autoimune. Uma hipótese levantada por LI *et al.* (2003), admite que um ou mais antígenos salivares do mosquito podem conter uma molécula que causa reação cruzada com a Dsg1 ou algum micro-organismo que desencadeia uma autorreação em pessoas geneticamente susceptíveis.

Também já foram verificadas associações entre certos alimentos e o pênfigo, como mandioca, castanha de caju, guaraná e outros alimentos que possuem o grupo fenol, além de alimentos que apresentam o grupo tiol, como alho, alho poró e cebola (TUR e BRENNER, 1997; TUR e BRENNER, 1998). Eles estariam agindo como indutores e ou acentuadores do desenvolvimento da doença. Esses mesmos autores também sugerem que pesticidas que apresentam o grupo formamida também podem desencadear a doença.

Do ponto de vista genético, alguns trabalhos já foram publicados, iniciando pelo trabalho pioneiro de PETZL-ERLER e SANTAMARIA (1989), que foram os primeiros a verificarem se genes *HLA* conferem susceptibilidade à doença. Foi encontrada associação positiva entre PF e *DR1* e *DR4*, além de associação negativa com *DR7* e *DQw2*. Também foi proposto os haplótipos *DR7-DQw2* e *DR3-DQw2* como fatores de proteção ao fogo selvagem.

Outros trabalhos, todos do grupo de pesquisa de Petzl-Erler, mostram várias outras associações com genes do sistema imune (PAVONI *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2004; MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009). Foram também analisados os polimorfismos do gene *DSG1* que codifica a desmogleína 1, a molécula alvo dos autoanticorpos patogênicos do PF (PETZL-ERLER e MALHEIROS, 2005), sendo objeto de pesquisa as variantes das posições 809(C>T) e 1660(A>C) do gene *DSG1*. Foi verificado que as frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas não diferiam estatisticamente entre os pacientes de PF endêmico e controles sadios da amostra brasileira. Não há, até o presente momento, nenhum trabalho investigando associações entre o pênfigo foliáceo e os genes que codificam os receptores das células NK, sendo este, um dos objetivos desse estudo.

### 3.5 TRATAMENTO

O tratamento do PF se dá principalmente por corticóides administrados por via oral. Normalmente é um tratamento prolongado com muitos efeitos colaterais indesejáveis, que incluem aumento de peso, hipertensão, hiperglicemia, osteoporose, úlcera gastrintestinal, gastrite e surtos psicóticos, além de infestações intestinais, infecções bacterianas extracutâneas, como pneumonias, infecções urinárias, tuberculose, entre outras. Os pacientes devem evitar contato direto com luz solar, uma vez que a luz ultravioleta é um dos

principais fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento e agravamento do PF, induzindo a formação de bolhas (CAMPBELL et al., 2001).

### 3.6 A IMPORTÂNCIA DAS NK NA AUTOIMUNIDADE

Desde 1980, vários estudos já descreveram uma diminuição acentuada do número e da atividade das células NK no sangue periférico em pacientes com doenças autoimunes, como artrite reumatóide, diabetes melitus, lúpus eritematoso sistêmico, entre outras. O papel das NK na autoimunidade, revisado por vários autores (FLODSTRÖM *et al.*, 2002; FRENCH, YOKOYAMA e WAYNE, 2004), será brevemente descrito a seguir.

Já foi observado que as NK atacam células alvo através de citocinas e citotoxicidade direta. As quimiocinas e citocinas liberadas por essas células influenciam o início da resposta imune adaptativa. Dessa forma, as funções das NK devem ser reguladas cuidadosamente para que não haja danos em tecido saudável ou liberação alterada dessas substâncias que poderiam desregular a atividade do sistema imune adaptativo.

Foi sugerido que as células NK, inicialmente reconhecidas como componentes da imunidade inata, também atuam na imunidade adaptativa. Linfócitos T autorreativos podem ser ativados quando autoantígenos ou moléculas semelhantes a eles são transportados para os órgãos linfóides e apresentados pelas células apresentadoras de antígenos. Portanto, uma etapa crítica de regulação acontece nesse local. Salazar-Mather, Biron e colaboradores (BIRON *et al.*, 1999; SALAZAR-MATHER *et al.*, 1996) sugeriram que as células NK migram para a região rica em células apresentadoras de antígenos e podem regular as respostas imunes em infecções virais. Outros estudos corroboram essa hipótese, mostrando que as células NK são recrutadas no local de apresentação de antígenos influenciando de maneira crítica e/ou regulando o início da resposta imune adaptativa.

A comunicação entre células NK e as células dendríticas não é unidirecional. A maturação das células dendríticas mediada por NK é o elo entre a resposta por NK e a resposta por células T. O contato com o receptor NKp30 das células NK influencia a maturação das células dendríticas, que também podem acentuar as atividades citolíticas e a produção de interferon pelas células NK.

As células dendríticas atuam apresentando antígenos para os linfócitos T. Além da ativação de células T, as células dendríticas regulam a proliferação e diferenciação de

linfócitos B e a secreção de imunoglobulinas, a aquisição de suas funções efetoras e recrutamento para os tecidos, o que pode trazer consequências para o desenvolvimento de resposta contra antígenos próprios. Esse conjunto de interações torna as NK importantes na atividade dos linfócitos B.

Foi descrita a participação das células NK no desenvolvimento da doença autoimune miastenia grave em ratos (SHI *et al.*, 2000) a qual é mediada por células B e anticorpos. Além disso, foi evidenciada uma relação forte entre as células NK e células T e B autorreativas.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVOS GERAIS

- Descrever a diversidade genética de *KIR* em populações e verificar possíveis evidências de seleção natural;
- Verificar se variantes genéticas de *KIR* participam da susceptibilidade ou resistência ao pênfigo foliáceo;
- Implementar um método de genotipagem alélica de *KIR3DL2* em alta resolução.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar as frequências de presença, gênica e fenotípica dos 14 genes e 1 pseudogene *KIR* na população de Curitiba;
- Estimar as frequências dos ligantes HLA de *KIR* na população de Curitiba e verificar se há evidências de coevolução dos complexos *KIR-HLA* através da análise de correlação das frequências alélicas de *KIR* e HLA;
- Verificar se o polimorfismo de ausência e presença de 14 genes e 2 pseudogenes *KIR* interfere na susceptibilidade ao pênfigo foliáceo;
- Verificar se combinações *KIR* (ausência/presença)-HLA interferem na susceptibilidade ao PF;
- Implementar um método de genotipagem alélica de *KIR3DL2* em alta resolução baseado em sequenciamento de DNA genômico;
- Verificar se o polimorfismo alélico de *KIR3DL2* combinado à presença de seu ligante HLA-A interfere na susceptibilidade diferencial ao PF;
- Analisar, discutir e questionar as possíveis causas das associações encontradas;
- Descrever o polimorfismo alélico de *KIR3DL2* em nove populações brasileiras de diferentes ancestralidades: Curitiba, Campo Grande, cinco populações indígenas Guarani e Kaingang, nipo-brasileiros e africanos;
- Encontrar e confirmar alelos ainda não descritos;
- Verificar se há evidências de seleção natural na região codificadora de *KIR3DL2*
- Contribuir para a compreensão da diversidade de genes relacionados à resposta imune e de sua importância para o PF.

## 5. RESULTADOS

A seção resultados é composta por cinco manuscritos, que serão apresentados a seguir.

São eles:

- *Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population* (publicado);
- *Activating KIR and their HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering disease of skin* (submetido);
- *KIR3DL2 high resolution allele typing by the sequence-based typing (SBT) method*
- *KIR3DL2 alleles are associated to differential susceptibility to the autoimmune disease pemphigus foliaceus.*
- *Characterization of the highly polymorphic KIR3DL2 in Amerindian and urban Brazilian populations: ten new alleles were found.*

Os artigos estão redigidos na língua inglesa, de acordo com as normas da Universidade Federal do Paraná e do Programa de Pós-Graduação em Genética.

## Diversity of the *KIR* gene cluster in an urban Brazilian population

D. G. Augusto · L. Zehnder-Alves · M. R. Pincerati ·  
M. P. Martin · M. Carrington · Maria Luiza Petzl-Erler

Received: 26 October 2009 / Accepted: 30 July 2011 / Published online: 18 August 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** The activity of natural killer cells depends on the balance between activating and inhibitory signals coming from their receptors. Among these are the killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) that recognize specific HLA class I allotypes. Here we characterized *KIR* genetic diversity and their HLA ligands in the population of Curitiba, Paraná State ( $n=164$ ), and compared it with other worldwide populations. The distribution of *2DL4* alleles was also analyzed. The Curitiba population did not differ significantly from European and Euro-descendant populations, but as an admixed population showed higher genetic diversity. We found 27 *KIR* profiles, many of them uncommon in European populations, in agreement with

the elevated historically recent gene flow in the study population. The frequencies of *KIR* genes and their respective HLA ligands were distributed independently and none of the analyzed individuals lacked functional KIR–HLA ligand combinations. *KIR* gene frequencies of 33 worldwide populations were consistent with geographic and ethnic distribution, in agreement with demography being the major factor shaping the observed gene content diversity of the *KIR* locus.

**Keywords** *KIR* genes · *KIR* diversity · Brazilian population · HLA ligands · *2DL4* allele frequencies

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00251-011-0565-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. G. Augusto · L. Zehnder-Alves · M. L. Petzl-Erler (✉)  
Laboratório de Genética Molecular Humana,  
Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná,  
Caixa Postal 19071, Curitiba 81531-980, Brazil  
e-mail: perler@ufpr.br

M. R. Pincerati  
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva,  
Universidade de São Paulo,  
Rua do Matão 277,  
São Paulo 05508-090, Brazil

M. P. Martin · M. Carrington  
Cancer and Inflammation Program, Laboratory of Experimental  
Immunology, SAIC-Frederick, Inc., NCI-Frederick,  
Frederick, MD 21702, USA

M. Carrington  
Ragon Institute of Massachusetts General Hospital,  
Massachusetts Institute of Technology and Harvard University,  
Boston, MA 02114, USA

Natural killer (NK) cells are crucial in innate immunity and influence the outcome of antigen-specific immune responses (Biron et al. 1999). They also contribute to placental development and the outcome of pregnancy (Trowsdale and Moffett 2008). NK cell function depends on complex cellular interactions mediated by membrane-bound and soluble gene products. Of prime importance are the inhibitory and activating killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) that bind major histocompatibility complex class I molecules. *KIR* are encoded by a cluster of homologous genes located on human chromosome 19q13.4 (Wende et al. 1999; Liu et al. 2000). *KIR* diversity is observed as presence/absence of genes, resulting in expansion and contraction of *KIR* haplotypes (Wende et al. 2000; Martin et al. 2003) and further diversity is provided by allelic variation of individual *KIR* genes. Almost 400 *KIR* profiles (i.e., genotypes defined by *KIR* gene content) have been identified among 190 populations catalogued online (www.allelefreqencies.net—Gonzalez-Galarza et al. 2011). The presence or absence of certain *KIR* genes as well as some KIR–HLA receptor–ligand combinations have been

shown to associate with various diseases (Khakoo and Carrington 2006; Jiao et al. 2008; Levinson et al. 2008). *KIR* genes may also be genetic landmarks of populations (Raves et al. 2008) and there are suggestions that *KIR* gene frequencies may be influenced by host/pathogen interactions (Kulkarni et al. 2008). There is also strong evidence that *HLA* and *KIR* are co-evolving (Single et al. 2007; Norman et al. 2007).

Much interest has been shown in the analysis of *KIR* gene frequencies in human populations as a means to understand the evolutionary causes and functional consequences of its polymorphism. However, the data thus far has been limited to a few geographic regions around the world and few Brazilian populations are represented (Middleton et al. 2008; Rudnick et al. 2008). Regarding allelic diversity, even less is known. In this study, we aimed to characterize *KIR* gene content polymorphism and *2DL4* allelic diversity in an urban Brazilian population and compare this with other populations. We also tested for correlations between *KIR* and *HLA* ligand frequencies that might support the hypothesis of co-evolution of these two unlinked loci.

The population from Curitiba (the Capital city of Paraná State, Brazil, located at 25°25' S and 49°17' W) is of mixed, predominantly European ancestry. A detailed description can be found in Probst et al. (2000) and Braun-Prado et al. (2000). The individuals tested ( $n=164$ ) were unrelated, healthy volunteers. All subjects were informed about the aims of the study and formally agreed to participate. The study has been performed according to Brazilian laws and was approved by the ethics committee of the Federal University of Paraná. A subset of individuals ( $n=99$ ) was sequenced for *2DL4*. The number of individuals in some analyses may vary because of quantitative and qualitative limitations of DNA. We tested for presence/absence of 15 *KIR* genes by PCR-SSP with two pairs of specific primers for each locus (Martin and Carrington 2008; Kulkarni et al. 2010). Unusual profiles were carefully analyzed and were retyped two to three times to validate the results. *HLA-A*, *HLA-B*, and *HLA-C* were previously genotyped by the PCR-SSOP method (Braun-Prado et al. 2000). The Allele frequencies.net database (Gonzalez-Galarza et al. 2011) was used as the reference to identify *KIR* profiles and to obtain data for comparisons between populations. Allelic subtyping of *2DL4* was carried out by amplification of exons 3, 4, 6, and 8 using gene-specific primers and the products were sequenced using the Big Dye terminator kit (Applied Biosystems). The primer sequences are available on request.

The carrier frequency ( $F$ ) of each *KIR* gene (presence/absence) was obtained by direct counting. *KIR* gene frequencies were estimated using Bernstein's formula  $f_G = 1 - \sqrt{1 - F}$ , where  $F$  corresponds to the frequency of carriers. Frequencies of the two pairs of "allelic genes", *2DL2*–*2DL3* and *3DL1*–*3DS1*, were estimated by two

approaches: (1) like the other *KIR* genes as just described, considering them as independent from each other, and (2) considering that they segregate as alleles of one locus with three alleles, two of which are codominant (the "genes") and the third one being recessive (absence of the gene). Haplotype A and B frequencies were also calculated by Bernstein's formula. The linkage disequilibrium (LD) parameter  $D$  corresponds to the difference between the estimated two-loci haplotype frequencies and the haplotype frequencies expected at equilibrium and was calculated as described by Mattiuz et al. (1970).  $D'$ , the LD coefficient standardized by the maximum value it can take given the allele frequencies (Lewontin 1964), was estimated with the Arlequin software package version 3.16 (Excoffier et al. 2005).

Thirty-two previously described worldwide populations were compared with the study population by the exact test of population differentiation included in the Arlequin software package v. 3.16. The non-informative pseudogenes and framework genes were excluded from the analysis. Genetic distances were estimated by Nei's method (Nei 1972) using PHYLIP—version 3.6 (Felsenstein 2004). A dendrogram was drawn by the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) and visualized with the TreeView software (Page 1996). The expected frequency of co-occurrence of *KIR* and their *HLA* class I ligands was estimated and compared to the observed frequency using the chi-square test. The receptor/ligand pairs tested were *KIR3DL1/S1*+*HLA Bw4*, *KIR 2DL2/3*+*HLA-C* group 1, and *KIR2DL1*+*HLA-C* group 2. In addition, we counted in each individual the number of functional *KIR*–*HLA* combinations to estimate their average number and to determine the proportion of individuals in the population lacking functional receptor/ligand combinations.

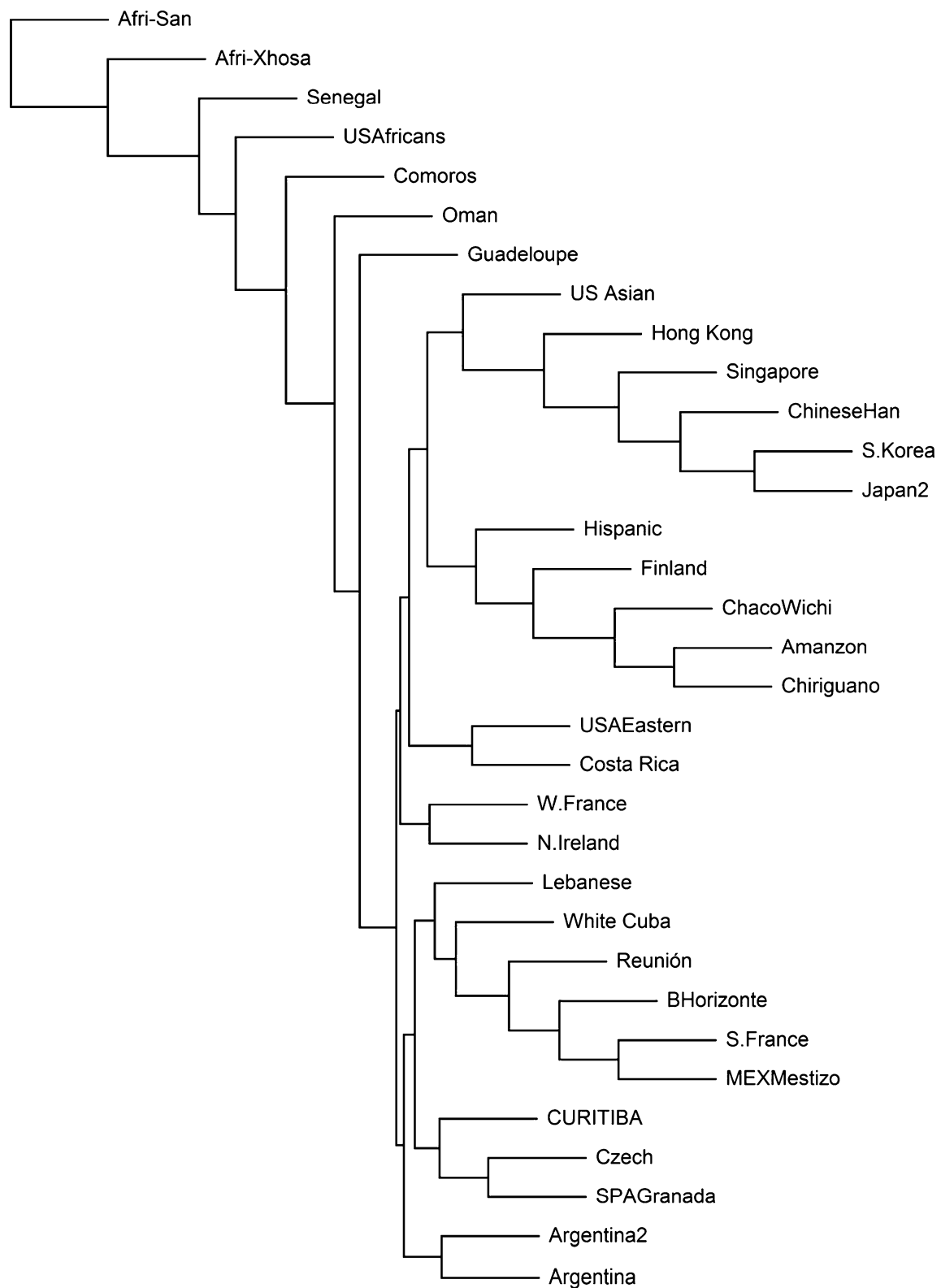
The carrier frequencies of the *KIR* genes in the study population varied from 31.9% (*2DS5*) to 100% (*2DL4*, *3DL2*, and *3DL3*). With the exception of *2DS4* (93.6%), no other activating *KIR* gene reached a carrier frequency of 60%. Overall, the frequencies of the inhibitory *KIR* genes were higher and more homogeneous among worldwide populations than for the activating genes (Table 1) and *KIR* gene frequencies in the study population are in agreement with the predominantly European ancestry of this population. Among all the *KIR* genes, only *2DL2* and *2DL3* differed significantly in frequencies between the Curitiba population and other populations with European ancestry (Table 1). The frequency of *2DL2* differed significantly between Curitiba and France and *2DL3* differed between Curitiba and some European and Euro-descendant populations, including the population from Belo Horizonte. The reason for this heterogeneity is not clear but it may reflect the ethnic admixture of some of these populations. It may also be related to the partially overlapping functions of

**Table 1** *KIR* gene frequencies in the population of Curitiba and in worldwide populations

<i>n</i>	<i>F (%)</i>	<i>f<sub>G</sub></i>	<i>f<sub>A</sub></i>	Czech 125	BHHorizonte 90	Argentina 102	France 108	Ireland 200	Palestine 105	India 145	USAfricans 58	Senegal 118	Camoros 54	Singapore 47	Hong Kong 100	Japan 132	China 106	S. Korea 154	Amazon 40
2DL1	97.4	0.84	–	95.0	96.7	96.1	97.0	96.0	83.0***	99.3	98.3	100.0	100.0	100.0	99.0	100.0	99.0	99.4	93.0
2DL2	59.4	0.36	0.36	59.0	52.2	62.5	50.0***	51.0	62.0	62.8	56.9	55.0	41.0*	28.2***	28.0***	11.4***	17.3***	14.3***	65.0
2DL3	84.6	0.61	0.55	86.0	94.4*	86.5	91.0***	93.0*	85.0	81.9	82.0	90.0	93.0	100.0**	98.0***	100.0***	99.0***	99.4***	80.0
2DL4	100.0	1.00	–	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
2DL5	51.9	0.31	–	52.0	58.9	55.7	47.0	44.0	63.0	71.0***	53.4	52.0	62.7	39.1	45.0	35.6**	68.7*	38.3**	85.0***
2DP1	94.7	0.77	–	94.0	96.7	96.1	97.0	97.0	NT	99.3	98.3	100.0	100.0	100.0	99.0	100.0	99.0	NT	NT
2DS1	42.1	0.24	–	43.0	37.8	45.4	36.0	34.0	44.0	62.8***	22.4	13.0***	17.0***	28.3	40.0	33.3	34.3	37.7	88.0***
2DS2	59.2	0.36	–	57.0	53.3	54.5	51.0	52.0	64.0	62.8	46.6	42.0**	30.0***	28.3***	28.0***	11.4***	17.3***	16.9***	58.0
2DS3	32.5	0.18	–	36.0	38.9	28.6	31.0	28.0	37.0	53.8***	27.6	24.0	20.0	17.4*	25.0	13.6***	12.5***	16.2***	10.0**
2DS4	93.6	0.75	–	92.0	95.6	95.0	96.0	95.0	88.0	86.1***	100.0	100.0**	96.0	97.8	94.0	99.2	94.2	94.2	78.0**
2DS5	31.9	0.17	–	26.0	32.2	35.4	27.0	26.0	27.0	51.0***	37.9	30.0	37.0	21.7	26.0	22.0	23.1	26.6	90.0***
3DL1	92.7	0.73	0.74	94.0	95.6	95.0	96.0	95.0	88.0	87.4	100.0*	99.0*	98.0	97.8	94.0	99.2**	94.2	94.2	65.0***
3DS1	37.3	0.21	0.26	38.0	41.1	42.0	44.0	35.0	39.0	62.2***	13.8***	4.0***	15.0**	30.4	39.0	31.9	32.7	36.4	70.0***
3DL2	100.0	1.00	–	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
3DL3	100.0	1.00	–	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

The asterisks indicate *p* values for the populations that differed significantly from Curitiba: \* $0.01 \leq p < 0.05$ ; \*\* $0.001 \leq p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . References are listed in Table 3. The populations are named as in the dendrogram

*n* number of individuals in the sample, *F* carrier frequency, *f<sub>G</sub>* gene frequency obtained by Bernstein's method, *f<sub>A</sub>* the gene frequency, considering the allelic status of 2DL2 and 2DL3, and of 3DL1, 3DS1, NT not tested



**Fig. 1** Nei's genetic distances of 33 worldwide populations visualized in a neighbor-joining dendrogram. Population references are given in Table 3

these genes. *2DL2* and *2DL3* segregate as alleles of one locus and both bind HLA-C group 1 molecules although ligand binding is stronger for *2DL2* (Moesta et al. 2008). Thus, *2DL2* and *2DL3* may be exposed to less severe functional constraints in comparison to other inhibitory *KIR* genes. Relaxation of selection may also permit greater fluctuation of frequencies as a consequence of demographic factors. The two-locus LD pattern was similar to other population studies (see Supplementary Figure 1).

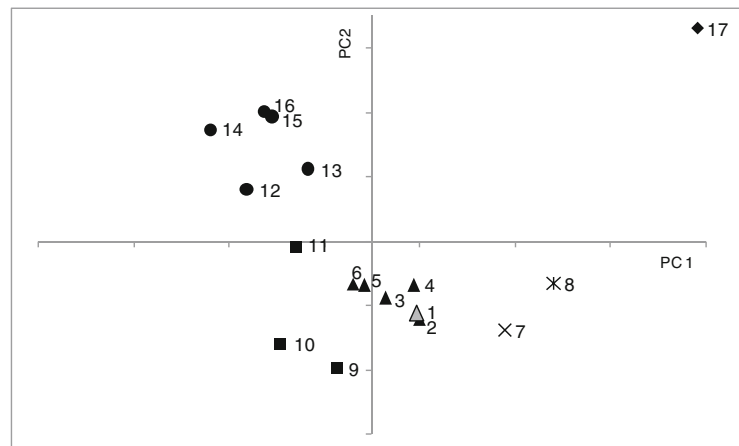
We characterized genetic distances based on *KIR* gene carrier frequencies of 33 populations, and the dendrogram generated is consistent with geography and ancestry (Fig. 1). In general, the European populations tended to cluster together including the Curitiba population, but Finland was somewhat separated from other Europeans. The most divergent are the Africans and they did not cluster in a single clade. It should however be stressed that internal nodes of the dendrogram do not represent a common ancestral population and that grouping of populations may result not only from common ancestry but also from gene flow (admixture), natural selection, or demographic factors resulting in random genetic drift, bottleneck, and founder effects. The principal component analysis (Fig. 2) also revealed that common ancestry is the major factor resulting in similarity of *KIR* gene frequencies, followed by gene flow and possibly random demographic factors.

The profiles observed in the study population are listed in Fig. 3. For comparison, the profiles found in Brazilians from Belo Horizonte (Middleton et al. 2008) are also

shown. We identified 27 profiles, eight of which accounted for 77.3% of all observed profiles. The profile representing homozygosity for haplotype A (profile 1 in Fig. 3) was the most frequent ( $F=28.8\%$ ), as reported for other European populations. The frequency of A and B haplotypes were estimated to be 0.54 and 0.46, respectively. The less frequent profiles that are uncommon in Europeans or Euro-descendants reflect the heterogeneous ancestry of this population. Apart from Europeans (Portuguese, Italian, Polish, German, Ukrainian, and others), Africans, as well as Amerindians who had lived in South America before the colonization, contributed to the present gene pool of our study population (Probst et al. 2000). Previous results from our group showed that the ancestry of this population is approximately 87% European, 8% African, and 5% Amerindian (Braun-Prado et al. 2000; Probst et al. 2000 and unpublished results). Therefore, the occurrence of profiles characteristic of non-Europeans and a higher diversity than that seen in other European populations is not unexpected. *KIR* haplotypes could be more informative as ancestry markers, but the recessive absence of *KIR* genes makes it difficult to accurately infer haplotypes in samples of unrelated individuals and segregation analysis would require analysis of a large sample of extended families. The *KIR* complex also has the potential to be a good ancestry marker after more studies describing its allele diversity become available.

We next compared *2DL4* allele frequencies between Curitiba and Belo Horizonte, another urban Brazilian

**Fig. 2** Principal components analysis of 17 worldwide populations, including the population of Curitiba



▲ = Europeans or Euro-descendants; ■ = Africans or African-descendants; ● = Asians; ◆ = Amerindians; × = Palestinians; ✕ = Asian Indians.

1 = Curitiba; 2 = Czech Republic; 3 = Belo Horizonte; 4 = Argentina; 5 = West France; 6 = Northern Ireland; 7 = Palestine; 8 = Asian Indians; 9 = US Africans; 10 = Senegal; 11 = Comoros; 12 = Singapore; 13 = Hong Kong; 14 = Japan; 15 = Han Chinese; 16 = South Korea; 17 = Amazonian Indians

		Profiles													Curitiba			Belo Horizonte			
#	ID	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	NG	N	F	N	F
1*	1																7	38	28.8	27	30.0
2*	4																9	18	13.6	6	6.7
3*	2																11	13	9.8	8	8.9
4*	5																11	10	7.6	11	12.2
5*	3																13	8	6.1	5	5.6
6*	7																13	6	4.5	3	3.3
7	71																10	5	3.8	0	0
8*	6																14	4	3.0	6	6.7
9	73																13	3	2.3	0	0
10*	70																12	3	2.3	3	3.3
11	104																7	2	1.5	0	0
12	81																11	2	1.5	0	0
13*	27																10	2	1.5	1	1.1
14	15																8	2	1.5	0	0
15	86																12	2	1.5	0	0
16*	11																12	2	1.5	1	1.1
17*	9																12	2	1.5	2	2.2
18	45																11	1	0.8	0	0
19	188																10	1	0.8	0	0
20	106																10	1	0.8	0	0
21	58																13	1	0.8	0	0
22	174																11	1	0.8	0	0
23	216																11	1	0.8	0	0
24	171																7	1	0.8	0	0
25	89																8	1	0.8	0	0
26	69																9	1	0.8	0	0
27	10																8	1	0.8	1	1.1
**	13																12	0	0	4	4.4
**	72																7	0	0	3	3.3
**	8																11	0	0	2	2.2
**	228																10	0	0	2	2.2
**	20																10	0	0	1	1.1
**	28																12	0	0	1	1.1
**	30																9	0	0	1	1.1
**	56																13	0	0	1	1.1
**	79																10	0	0	1	1.1
**	90																12	0	0	1	1.1

**Fig. 3** KIR profiles observed in the population from Curitiba and Belo Horizonte. Profiles found in Curitiba (present study) and Belo Horizonte, another urban Brazilian population (Middleton et al. 2008). \* Profiles found in both populations. \*\* Profiles not found in Curitiba. ID is the identification number in Allele frequencies.net

(Gonzalez-Galarza et al. 2011); NG is the number of genes per profile (excluding pseudogenes), N number of individuals with a given profile, F relative frequency (%). Genes shown in gray are found exclusively on B haplotypes. Filled boxes indicate presence of a KIR gene and open boxes indicate absence of the gene

population (Table 2, top) and found that there were significant differences in allele frequencies (See Table 3 for references of Belo Horizonte and other populations used for comparisons). However, this difference can be explained

by the low typing resolution used in the Belo Horizonte study, where only exons 3 and 4 that encode the extracellular domains were sequenced (Williams et al. 2004; Middleton et al. 2008). The allele pairs 00202 and



**Table 2** *KIR2DL4* allele frequencies in Curitiba and in Belo Horizonte

Allele	Curitiba ( <i>n</i> =99)		Belo Horizonte ( <i>n</i> =90)
	<i>f<sub>A</sub></i>	<i>F</i> (%)	<i>F</i> (%)
2DL4*00102/5	0.28	44.4	50.0
2DL4*00501	0.21	35.4	53.3
2DL4*00802	0.15	28.3	0.0
2DL4*00801	0.13	23.2	0.0
2DL4*011	0.11	15.2	0.0
2DL4*00103	0.06	10.1	0.0
2DL4*006	0.04	5.1	9.0
2DL4*010	0.01	2.0	0.0
2DL4*00104	0.01	1.0	0.0
2DL4*00202	0.00	0.0	27.9
2DL4*00201	0.00	0.0	28.7
Allele groups <sup>a</sup>			
2DL4*00102/5+00103	0.34	54.5	50.0
2DL4*00501+011	0.32	50.5	53.3
2DL4*00802+00201	0.15	28.3	28.7
2DL4*00801+00202	0.13	23.2	27.9

Data for Belo Horizonte from Middleton et al. (2008)

*n* number of individuals, *f<sub>A</sub>* allele frequency, *F*(%) carrier frequency

<sup>a</sup> Alleles were grouped considering the ambiguities of the low resolution typing employed for the analysis of Belo Horizonte's population (Middleton et al. 2008)

00801, and 00201 and 00802, differ only in an adenine deletion in exon 6, which encodes the transmembrane domain. Differences in exons 6 and 8 also discriminate between 00501 and 011, and between 00102 and 00103, respectively. When the ambiguous allele pairs were grouped (Table 2, bottom), their frequencies did not differ significantly ( $p=0.67$ ). This is noteworthy because of the differential contribution of Europeans to these two populations: while the European ancestry component of Belo Horizonte is essentially Iberian, in Curitiba, apart from the Portuguese, other Mediterranean and central and eastern Europeans account for a high proportion of the immigrants (Probst et al. 2000). Further, the French (Buhler et al. 2009) and the USA populations (Gedil et al. 2005) typed at the same high resolution as in our study, show *2DL4* allele frequencies similar to those seen in Curitiba ( $p>0.05$ ; data not shown). Thus, the similarity between Curitiba and Belo Horizonte provides additional evidence of low differentiation across Europeans for *2DL4*. Based on the adenine deletion in exon 6, nucleotide position 811, two groups of *2DL4* alleles have been defined, referred to as 9A (the deleted) and 10A (Witt et al. 2000). The two groups differ markedly with respect to *2DL4* expression and function. Deletion alleles cannot be expressed as membrane-bound receptors due to excision of the transmembrane domain as a

consequence of the frame shift caused by the adenine deletion. (Goodridge et al. 2003; Goodridge et al. 2007). In our study population, 57.6% of the individuals have a deleted 9A allele in at least one chromosome and 18.2% are homozygous for 9A and therefore lack cell surface *2DL4* receptors. It has been suggested that these two allele groups are maintained at intermediate frequency by balancing natural selection (Witt et al. 2000; Goodridge et al. 2003). This hypothesis is supported by the high frequency of both the deleted and the undeleted allele groups. *2DS4* also exhibits deletion and nondeletion allelic variants. A group of *2DS4* alleles have a deletion of 22 bp in exon 5, encompassing codons 131 to 137 and the first nucleotide of codon 138 within the D2 extracellular domain (Maxwell et al. 2002; Hsu et al. 2002). This results in a frame shift yielding a truncated protein with no transmembrane or cytoplasmic domains and is therefore not expressed on the cell surface. The truncated *2DS4* carrier frequency in Curitiba was 75%. In France this allele group is also very common (carrier frequency 84%), while in Senegal the frequency is lower (carrier frequency 48%) (Denis et al. 2005). *2DS4* is the only classical activating receptor found on the A haplotype, and interestingly we estimated that in Curitiba 33% of individuals homozygous for haplotype A (corresponding to 13.6% of the detected profiles) are homozygous for the deletion, and therefore lack a functional classical activating KIR.

Because *KIR* and *HLA* are both highly polymorphic and because these two gene clusters segregate independently, an individual may have receptor and no ligand or vice versa. Previous studies have also highlighted the relevance of *KIR* with their *HLA* ligands in disease pathogenesis and resistance to viral infections, thus we evaluated the *KIR*–*HLA* class I ligand combinations in our population. With respect to 2DL1, 2DL2, 2DL3, and 3DL1, the present population sample exhibited an average of 2.9 functional receptor–ligand pairs per individual and each individual carried at least two functional receptor–ligand pairs. The inhibitory 2DL1 binds HLA-C group 2 allotypes with lysine at position 80, and 2DL2/3 receptors bind HLA-C group 1 allotypes, with asparagine at the same position. 3DL1 recognizes HLA-A and HLA-B allotypes with the Bw4 motif. The Bw4 positive HLA-A molecules (A\*23, A\*24, A\*25, and A\*32) have isoleucine at position 80 (Bw4-80I) that is also present in a subset of the HLA-B Bw4 molecules. HLA-B Bw4-80I molecules exhibit stronger interactions with their cognate KIR receptors than Bw4-80T (threonine) bearing HLA-B molecules (Cella et al. 1994; Carr et al. 2005). In the present study, we observed a similar frequency of Bw4-80I from both the *HLA-A* and *HLA-B* loci (0.20 and 0.24, respectively). Of the individuals lacking HLA-B Bw4, 47% had a Bw4 HLA-A allele. The high frequency of HLA-A molecules

**Table 3** References for the populations used in the estimation of genetic distances and principal components analysis

Name as in the dendrogram	Population name and sample size	Reference
Amazon	Amazon Amerindians 40	Ewerton et al. 2007
Argentina	Argentina 102	Unpublished data *
Argentina 2	Argentina Buenos Aires 365	Flores et al. 2007
ChacoWichi	Argentina Chaco Wichis 82	Flores et al. 2007
Chiriguano	Argentina Chiriguano 54	Flores et al. 2007
Czech	Czech Population	Pavlova et al. 2008
BHorizonte	Brazil Belo Horizonte 90	Middleton et al. 2008
ChineseHan	China Zhejiang Han 104	Jiang et al. 2005
Comoros	Comoros 54	Frassati et al. 2006
Costa Rica	Costa Rica Guanacaste 117	Carrington et al. 2005
White Cuba	Cuban White 70	Middleton et al. 2008
Curitiba	Euro-descendants 164	Present study
Finland	Finland Helsinki 101	Denis et al. 2005
S. France	France Southeast pop2 38	Frassati et al. 2006
W. France	France West 108	Denis et al. 2005
Guadeloupe	Guadeloupe 118	Denis et al. 2005
Hong Kong	Hong Kong Chinese 100	Middleton et al. 2008
N. Ireland	Ireland Northern pop2 154	Middleton et al. 2008
Japan2	Japanese 132	Yawata et al. 2006
Lebanese	Lebanon 120	Mahfouz et al. 2006
MEX Mestizo	Mexico Veracruz Mestizos 51	Contreras et al. 2007
Oman	Oman 99	Middleton et al. 2008
Palestine	Palestine Jordan 105	Norman et al. 2001
Reunion	Reunion 101	Denis et al. 2005
Senegal	Senegal 90	Denis et al. 2005
Singapore	Singapore Chinese 47	Middleton et al. 2008
Afri-San	South African San 91	Middleton et al. 2008
Afri-Xhosa	South African Xhosa 50	Middleton et al. 2008
S. Korea	South Korea 154	Whang et al. 2005
SPAGranada	Spain Granada 100 WS	Middleton et al. 2007
US Africans	US California African Americans 58	Du et al. 2007
US Asian	US California Asian Americans 150	Du et al. 2007
USAEastern	Euro-descendants from USA 213	Carrington et al. 2005
Hispanic	US California Hispanics 128	Du et al. 2007
India	India 145	Kulkarni et al. 2008

\*Population data available on Allele frequencies.net database (Gonzalez-Galarza et al. 2011)

with the Bw4 epitope suggest that these HLA-A and HLA-B allotypes may be equally important for NK cell function.

The frequencies of the HLA ligands are shown in Supplementary Table 1. All ligands and their respective receptors were distributed independently ( $p=0.44$ , data not shown). This might indicate that natural selection acting on specific receptor/ligand combinations is not a major factor determining their population frequencies. Alternatively, the KIR–HLA frequencies might be at equilibrium in this population. However, this result should be interpreted with caution, because for a statistically significant association to

be observed in such a population sample, the selection pressure would need to be unusually strong.

The heterogeneous colonization and the continued migrations during the five centuries of Brazil's history as well as the high frequency of interethnic unions, has resulted in an admixed population whose ancestry differs among geographic regions. This is the first study describing *KIR2DL4* allele frequencies in a Southern Brazilian population of predominately European background and only a few South American populations have thus far been analyzed with respect to *KIR* gene content variation and

*KIR* gene allelic frequencies. The European origins of the population of Curitiba are more heterogeneous than that of most other Brazilian populations. Nevertheless, its *KIR* gene content and *2DL4* allelic diversity are generally similar to those of most European populations. More effort should be dedicated to analyze other admixed and unique isolated populations of various ancestries existing in Brazil and all over the world in order to provide more informative data for evolutionary and functional analyses of *KIR* polymorphism.

**Acknowledgments** We thank the staff of the Laboratory of Human Molecular Genetics at the Department of Genetics of the Federal University of Paraná for assistance and support. Special thanks to Liana Alves de Oliveira for her expertise and valuable comments. We also thank Fuh-Mei Duh and Colm O'hugin for helpful advice and Maria Dias da Silva for reading this manuscript. This project received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX, Institutos do Milênio, Fundação Araucária, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This project was funded in part with federal funds from the National Cancer Institute, National Institutes of Health, under contract HHSN261200800001E. The content of this publication does not necessarily reflect the views or policies of the Department of Health and Human Services, nor does mention of trade names, commercial products, or organizations imply endorsement by the US Government. This Research was supported in part by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute, Center for Cancer Research.

## References

- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17:189–220
- Braun-Prado K, Vieira Mion AL, Farah Pereira N, Culp L, Petzl-Erler ML (2000) HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens* 56:417–427
- Buhler S, Di Cristofaro J, Frassati C, Basire A, Galicher V, Chiaroni J, Picard C (2009) High levels of molecular polymorphism at the KIR2DL4 locus in French and Congolese populations: impact for anthropology and clinical studies. *Hum Immunol* 70(11):953–959
- Carr WH, Pando MJ, Parham P (2005) KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* 175(8):5222–5229
- Carrington M, Wang S, Martin MP et al (2005) Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 201:1069–1075
- Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, Colonna M (1994) NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med* 180(4):1235–1242
- Contreras G, Aláez C, Murguía A, García D, Flores H, Gorodezky C (2007) Distribution of the killer cell immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos. *Tissue Antigens* 69:125–129
- Denis L, Sivula J, Gourraud PA et al (2005) Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens* 66:267–276
- Du Z, Gjertson DW, Reed EF, Rajalingam R (2007) Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. *Immunogenetics* 59:1–15
- Ewerton PD, Leite Mde M, Magalhães M, Sena L, Melo dos Santos EJ (2007) Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. *Immunogenetics* 59:625–630
- Excoffier L, Laval LG, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50
- Felsenstein J (2004) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
- Flores AC, Marcos CY, Paladino N et al (2007) KIR genes polymorphism in Argentinean Caucoid and Amerindian populations. *Tissue Antigens* 69:568–576
- Frassati C, Touinssi M, Picard C et al (2006) Distribution of killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) in Comoros and Southeast France. *Tissue Antigens* 67:356–367
- Gedil MA, Steiner NK, Hurley CK (2005) Genomic characterization of KIR2DL4 infamilies and unrelated individuals reveals extensive diversity in exon and intron sequences including a common frameshift variation occurring in several alleles. *Tissue Antigens* 65:402–418
- Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR (2011) Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acid Research* 39:D913–D919
- Goodridge JP, Witt CS, Christiansen FT, Warren HS (2003) KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells. *J Immunol* 171:1768–1774
- Goodridge JP, Lathbury LJ, Steiner NK, Shulze CN, Pullikotil P, Seidah NG, Hurley CK, Christiansen FT, Witt CS (2007) Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. *Eur J Immunol* 37:199–211
- Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B (2002) Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework aplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 169:5118–5129
- Jiang K, Zhu FM, Lv QF, Yan LX (2005) Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. *Tissue Antigens* 65:556–563
- Jiao YL, Ma CY, Wang LC, Cui B, Zhang J, You L, Chen ZJ, Li JF, Zhao YR (2008) Polymorphisms of KIRs gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing spondylitis: possible association with susceptibility to the disease. *J Clin Immunol* 28:343–349
- Khakoo SI, Carrington M (2006) KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev* 214:186–201
- Kulkarni S, Single RM, Martin MP, Rajalingam R, Badwe R, Joshi N, Carrington M (2008) Comparison of the rapidly evolving KIR locus in Parsis and natives of India. *Immunogenetics* 60:121–129
- Kulkarni S, Martin MP, Carrington M (2010) KIR genotyping by multiplex PCR-SSP. (2010). *Methods Mol Biol* 612:365–375
- Levinson RD, Du Z, Luo L, Holland GN, Rao NA, Reed EF, Rajalingam R (2008) KIR and HLA gene combinations in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Hum Immunol* 69:349–353
- Lewontin RC (1964) The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 49:49–67
- Liu WR, Kim J, Nwankwo C, Ashworth LK, Arm JP (2000) Genomic organization of the human leukocyte immunoglobulin-like receptors within the leukocyte receptor complex on chromosome 19q13.4. *Immunogenetics* 51:659–669

- Mahfouz R, Rayes R, Mahfoud Z, Bazarbachi A, Zaatari G (2006) Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genotypes in the Lebanese population. *Tissue Antigens* 68:66–71
- Martin MP, Carrington M (2008) KIR locus polymorphisms: genotyping and disease association analysis. *Methods Mol Biol* 415:49–64
- Martin MP, Bashirova A, Traherne J, Trowsdale J, Carrington M (2003) Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. *J Immunol* 171:2192–2195
- Mattiuz PL, Ihde D, Piazza A, Ceppellini R, Bodmer WF (1970) New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system. In: Terasaki P (ed) *Histocompatibility testing 1970*. Copenhagen, Munksgaard, 1971:193–205
- Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD (2002) A common *KIR2DS4* deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens* 60:254–258
- Middleton D, Vilchez JR, Cabrera T, Meenagh A, Williams F, Halfpenny I, Maleno I, Ruiz-Cabello F, Lopez-Nevot MA, Garrido F (2007) Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterized bladder, colorectal and laryngeal tumours. *Tissue Antigens* 69:220–226
- Middleton D, Meenagh A, Moscoso J, Arnaiz-Villena A (2008) Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue Antigens* 71:105–113
- Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M, Parham P (2008) Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J Immunol* 15:3969–3979
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Amer Naturalist* 106:283–292
- Norman PJ, Stephens HA, Verity DH, Chandanayingyong D, Vaughan RW (2001) Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics* 52:195–205
- Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K et al (2007) Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nat Genet* 39:1092–1099
- Page RD (1996) TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357–358
- Pavlova Y, Kolesar L, Striz I, Jabor A, Slavcev A (2008) Distribution of KIR genes in the Czech population. *Int J Immunogenet* 35:57–61
- Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, de Dalalio MMO, Visentainer JE, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML (2000) HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol* 72:597–617
- Rayes R, Bazarbachi A, Khazen G, Sabbagh A, Zaatari G, Mahfouz R (2008) Natural killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) genotypes in two arab populations: will KIR become a genetic landmark between nations? *Mol Biol Rep* 35:225–229
- Rudnick CC, Franceschi DS, Marangon AV, Guelson GA, Sell AM, Visentainer JE (2008) Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Hum Immunol* 69:872–876
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol and Evol* 4:406–425
- Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR, Kidd KK, Carrington M (2007) Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet* 39:1114–1119
- Trowsdale J, Moffett A (2008) NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Semin Immunol* 20:317–320
- Whang DH, Park H, Yoon JA, Park MH (2005) Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families. *Hum Immunol* 66:146–154
- Williams F, Meenagh A, Sleator C, Middleton D (2004) Investigation of killer cell immunoglobulinlike receptor gene diversity: I. KIR2DL4. *Hum Immunol* 65:31–38
- Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A (1999) Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mamm Genome* 10:154–160
- Wende H, Volz A, Ziegler A (2000) Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster. *Immunogenetics* 51:703–713. Erratum in: *Immunogenetics* (2001) 52:308
- Witt CS, Martin A, Christiansen FT (2000) Detection of KIR2DL4 alleles by sequencing and SSCP reveals a common allele with a shortened cytoplasmic tail. *Tissue Antigens* 56:248–257
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P (2006) Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 203:633–645

**Supplementary Table 1.** Frequencies of HLA ligands for KIR3DL1/S1, KIR2DL1 and KIR2DL2/3 in the population of Curitiba.

<b>Ligands</b>	<b>Allele Frequencies</b>	<b>Carrier frequencies (%)</b>
<i>C1 (HLA-C)</i>	0.66	83.6
<i>C2 (HLA-C)</i>	0.34	50.9
<i>HLA-B Bw4</i>	0.39	62.7
<i>Bw4-80I (HLA-B)</i>	0.24	45.2
<i>Bw4-80I (HLA-A)</i>	0.20	33.8

[illegible]

## Activating KIR and their HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering disease of skin

Danillo G. Augusto<sup>1</sup>; Sara C. Lobo Alves<sup>1</sup>; Marcia F. Melo<sup>2</sup>; Noemi F. Pereira<sup>2</sup> and Maria Luiza Petzl-Erler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná;

<sup>2</sup> Laboratório de Imunogenética, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná

### Corresponding author:

Prof. Dr. Maria Luiza Petzl-Erler  
Departamento de Genética  
Universidade Federal do Paraná  
Caixa Postal 19071  
81531-990 Curitiba, Brazil  
Tel: (+5541) 33611746; 33611724  
Fax: (+5541) 33611793  
e-mail: danillo@ufpr.br; perler@ufpr.br

### Abstract

The *KIR* genes and their HLA class I ligands have thus far not been investigated in pemphigus foliaceus (PF) and related autoimmune diseases, such as pemphigus vulgaris. We genotyped 233 patients and 203 controls for *KIR* by PCR-SSP. *HLA* typing was performed by LABType SSO reagent kits. We estimate the odds ratio, 95% confidence interval and performed logistic regression analyses to test our hypothesis. We found significant negative association between activating genes and PF. The activating *KIR* genes may have an overlapping effect in PF susceptibility and the presence of more than three activating genes was protective (OR=0.49,  $p=0.003$ ). Strong protective association was found for higher ratios activating/inhibitory *KIR* (OR=0.44,  $p=0.001$ ). *KIR3DS1* and the HLA-Bw4 were negatively associated to PF either isolated or combined, but higher significance was found for the presence of both together (OR=0.34,  $p<10^{-3}$ ) suggesting that the activating function is the major factor interfering in the PF pathogenesis. HLA-Bw4 (80I and 80T) isolated was decreased in patients and we have evidences that HLA-Bw4(80T) is also important as *KIR3DS1* ligand, being the association of this pair (OR=0.07,  $p=0.001$ ) stronger than *KIR3DS1*-Bw4(80I) (OR=0.31,  $p=0.002$ ). Higher levels of activating *KIR* signals appeared protective to PF. The activating *KIR* genes have been commonly reported increasing the risk for autoimmunity, but particularities of PF, like the well documented influence the environmental exposure in the pathogenesis of this disease, may be the reason why activated NK cells probably protect against pemphigus foliaceus.

**Key words:** killer cell immunoglobulin-like receptors, HLA, pemphigus foliaceus, fogo selvagem, autoimmunity, NK cell



## Introduction

Pemphigus is a group of blistering autoimmune diseases of the skin that can be subdivided in two major clinical types: pemphigus foliaceus (PF) and pemphigus vulgaris (PV). The target of the autoantibodies differ between these two subtypes: while in PF the antibodies are directed to desmoglein 1 (dsg1), in PV they are direct to desmoglein 3 or to both desmoglein 1 and desmoglein 3 [1]. Endemic in Brazil, PF was first reported in this country in 1903, thought to be a variant of a superficial mycosis [2]. PF represents a health problem in Brazil with an incidence of 25-35 cases/million/year. The highest prevalence of 3.4% was reported for the Terena Amerindian population that sums a total of about 1,200 individuals, in southern Mato Grosso do Sul State [3]. This disease manifests usually in rural workers and other low-wage earners, living near rivers, exposed to bad conditions of life [4]. The anti-dsg1 antibodies in PF (mainly of the IgG4 subclass) recognize epitopes of the amino-terminal domains of the extracellular portion of desmoglein 1[5], affecting the intercellular junction. The epidermal cell detachment (acantholysis) produces blistering lesions that may appear as localized or generalized forms, being a suffering and painful disease.

The etiology of PF is still unclear. As a multifactorial disease, there are environmental and genetic factors. The first genetic association with PF was reported in 1989 by our group [6] and was corroborated by further studies [7] that showed the importance of the *HLA-DR* and *HLA-DQ* genes in the susceptibility to PF. The polymorphism of other genes, as those coding for cytokines [8], desmoglein 1 [9], *CTLA4* [10,11] *CD40L*, *CD40*, *BLYS* and *CD19* [12] has also been analyzed.

NK cells are important for the immune response, being controlled by activating and inhibitory receptors. The killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and their cognate HLA class I ligands are crucial for NK regulation [13]. The ligands of several inhibitory (2DL and 3DL) and activating (2DS and 3DS) KIR have been described. The KIR2DL1 recognizes HLA-C2 while KIR2DL2 and 2DL3 recognize the allotypes of HLA-C named C1 and C2 [14]. KIR2DS1 and 2DS2 appear to exhibit weak recognition for HLA-C2 and HLA-C1 respectively [15,16]. KIR3DL1 binds the epitope Bw4, that comprises about 40% of the HLA-B allotypes and some of the HLA-A molecules (A\*23, A\*24, A\*25 and A\*32) [17]. The Bw4 positive HLA-A molecules and also a subset of the HLA-B Bw4 molecules that have isoleucine at position



80 (Bw4-80I) showed stronger interaction with KIR receptors than Bw4-80T (threonine) [18,19]. Despite HLA-B epitopes are currently regarded as KIR3DL1 ligands, we recently suggested that both HLA-A and HLA-B allotypes may be equally important for NK cell function [20]. Moreover, it has been demonstrated that KIR3DS1 may also interact with Bw4 molecules [21].

Natural killer (NK) cells may play an important role in autoimmune diseases of the skin [22]. Takahashi *et al.* [23] showed that a higher percentage and number of NK cells are present in peripheral blood of PV patients. Moreover, the NK cell of patients exhibited lower levels of perforin and granzyme. Evidences that NK may play role in the pathobiology of PV were also reported [24]. *KIR* polymorphism and combinations KIR/HLA have been associated with several disease, including autoimmune [25], but the importance of NK and *KIR* in pemphigus foliaceus has not yet been explored. The aim of this work was to verify if *KIR* polymorphism and their known HLA ligands influence the susceptibility or resistance to PF.

## Results

The frequencies of all analyzed genes in patients and controls are seen in Figure 1. Framework genes were also tested and present in all individuals. All gene frequencies are listed in Supplementary Table 1. The absence/presence polymorphism of *KIR2DS1*, *KIR2DS3*, *KIR3DS1* and *KIR2DL5* was found negatively associated with PF while *KIR3DL1* was positively associated to the disease (Table 1). As extensively known, *KIR* haplotypes are subdivided in two major haplogroups (A and B), being the A haplogroup characterized by the presence of only *KIR2DS4* as classic activating gene [26]. We found that the A/A genotype is associated to higher susceptibility to PF and that the presence of B haplotypes is protective (Table 2).

The number of inhibitory and of activating genes was compared between patients and controls. The function of *KIR2DL4* is controversial, once it has an inhibitory motif (ITIM) in the intracellular domain [27] and an arginine in the transmembrane domain, putatively responsible for activating function [28]. It has been reported that the predominant function of *KIR2DL4* is activating [28,29] and for that reason, this gene was considered as activating in our analyzes. No protein product or ligand was reported for the *KIR3DL3* gene thus far [30]. Therefore, this gene was removed from our analyses, considering its function is still obscure. The deleted form of *KIR2DS4* was not counted as activating neither as inhibitory. We found a

significant association for the presence of more than three activating genes (OR = 0.49, 95% CI = 0.30 - 0.79,  $p = 0.003$ ) which also means an odds ratio of 2.08 (95% CI = 1.25 - 3.32) for the presence of three or less activating genes (Figure 3A). For inhibitory genes, no statistical differences were found (Figure 3B). Further, we analyzed the ratio activating/inhibitory genes and the frequencies are shown in Figure 4. A strong negative association was found for the ratio equal or higher than 0.75 (OR = 0.44; 95% CI = 0.27 – 0.73;  $p = 0.001$ ).

The model tested in regression analyzes included the follow components: Presence of each of the negatively associated genes (*KIR2DS1*, *KIR2DS3*, *KIR3DS1* and *KIR2DL5*), presence of HLA ligands (Bw4, C1 and C2), the presence of more than three activating genes and the occurrence of activating/inhibitory genes ratio equal or higher than 0.75. The logistic regression analysis showed that the presence of more than three activating genes alone explained the result (OR = 0.23, 95% CI = 0.11 – 0.49,  $p < 10^{-3}$ , log likelihood = 153.004)

The frequent deletion of 22pb in a group of *KIR2DS4* alleles reported by Hsu *et al.* [31] generates a truncated protein with no transmembrane or cytoplasmic domains and not even expression on the cell surface. We investigated if this deletion, and consequently the loss of the *KIR2DS4* activating function, interferes in PF susceptibility and no significant result was found ( $p > 0.05$ ).

We analyzed all known HLA class I KIR ligands. The presence of one or more Bw4 epitopes (Bw4 80T and Bw4 80I from the *HLA-A* or *HLA-B* loci) was negatively associated (OR = 0.45,  $p = 0.005$ ). Bw4 80T was also associated to protection against the disease (OR = 0.37,  $p = 0.001$ ) but we did not find any association for Bw4 80I individually. We observed a strong and positive association for the presence of Bw6 (OR = 4.28,  $p < 10^{-3}$ ). All data for HLA ligands association can be seen in Table 3. The KIR x HLA combinations were analyzed and are shown in Figure 2 (also in Supplementary table 2). We found negative associations for combinations including *KIR3DL1/S1* and Bw4 ligands. We did not find any association for *KIR2DL1*, *KIR2DL2/3*, *KIR2DS2* and *KIR2DS3* combined with their HLA-C ligands (data not shown).

## Discussion

This is the first study describing the *KIR* gene frequencies in an urban population living in Western Brazil (Figure 1) and, for the first time, we show genetic association between susceptibility to pemphigus foliaceus and *KIR* genes and their HLA ligands.

All negatively associated genes (*KIR2DS1*, *KIR2DS3*, *KIR3DS1* and *KIR2DL5* – Table 1) are not present in haplotype A, what could indicate, at first moment, that the presence of the B haplotype and not of each isolated gene, may protect against PF. In fact, we found genetic association for the presence of B haplotypes (Table 2). In addition, we analyzed all pairs of associated genes for presence of both, presence of one or the other and absence of both (data not shown). Whenever statistical analysis was possible, we observed that the associated genes demonstrated an additive effect, appearing to be equally important for PF protection. Considering the fact that combinations of several activating genes are typically found in B haplotypes [26], we hypothesized that the KIR activating function, rather than the isolated receptors, could be the cause of the differential susceptibility. Counting the number of activating genes in each individual, it became clear that the presence of a higher number of activating genes has a protective effect (Figure 2A). As expected by this hypothesis, the number of inhibitory genes did not differ significantly between patients and controls (Figure 2B). It is consensus that the balance of activating and inhibitory signals has a major effect on NK cell function [32]. Bearing that in mind, we evaluated the ratio activating/inhibitory genes (Figure 3) and a stronger negative association was found (OR = 0.44 p = 0.001). These results point to an at least partially redundant function among the activating genes and they may be all equally involved in PF protection. This hypothesis was corroborated by the regression analyzes, which showed the presence of more than three activating genes as the major factor of differential susceptibility. A similar conclusion was also reported by van der Slik *et al.*, [33] who extensively tested many regression models in type 1 diabetes, showing that activating KIR genotypes influence the overall hierarchy of protection or susceptibility.

A summary of case/control studies in which *KIR* and *KIR+HLA* combinations are associated with autoimmune diseases are shown in Table 4. In general, activating *KIR* genes seem to increase the autoimmune response, being regarded as susceptibility factors in several studies. However, the interactions among NK cell receptors and HLA ligands may play a different role in the different diseases.

The importance of NK cell in autoimmunity mediated by B cell has been studied, [34] showing that NK activation can result in altered antibody responses, including those against autoantigens. Many autoimmune diseases are suspected to be related with infectious etiology, taking the NK cell, responsible for the first line of defense, to an important role in the protection against autoimmunity. Particularities of PF could explain why the activating KIR function is protecting against this disease. Different from other autoimmune diseases, PF is directly related with some geographical areas, being endemic in certain Western and Northern Brazilian regions. This correlation and also the gradual replacement of this endemic area beyond years show that one (or more) environmental factor is triggering the disease. Although the exact nature of the environmental contribution is still obscure, there are evidences that a black fly from the Simuliidae family could be involved in the infection with a protein, a virus or a microorganism which could initiate the autoimmune response in genetic susceptible individuals [35]. This agent does not need to result in an overt disease in the exposed individuals but is related to the onset of pemphigus foliaceus. Moreover, other factors are also associated to PF, as the quality of life, vicinity to rivers, some food, among others [4]. Schleinitz *et al.* [36] presented other hypotheses why NK cells could protect against autoimmunity. They could control the presentation of autotigens by killing the immature dendritic cells or control the activation of macrophages which are responsible for tissue injury in chronic inflammation. However, in this particular disease, the activation of NK cells controlling the release of autoantigens, mainly by regulating the environmental factors, such virus or other pathogens, could explain why the activating KIR function may be protective.

Only two inhibitory genes differed in patients and controls. *KIR3DL1* was associated to increased susceptibility (OR = 2.1;  $p = 0.03$ ). The increase of inhibitory signals, which means reduction of the ratio of activating to inhibitory receptors, could be the biological reason of this association. On the other hand, the haplotype B gene *KIR2DL5* could be negatively associated to PF in Euro-descendants only because of the linkage disequilibrium with several activating genes. In a recent work, we reported high positive LD values for the pairs *KIR2DL5* and other haplotype B activating genes in a Southern Brazilian population of predominantly European ancestry [20].

The different association patterns between Euro-descendant and Afro-descendant samples could be consequences of the complexity of the disease. The function of the

molecules depends directly on the context of joint pathways. Many unknown factors related to PF susceptibility may be involved in a complex interaction and may depend particularly on the ethnic context. Among all factors involved in resistance or susceptibility to PF, the activating *KIR* relative effect in Euro-descendants is possibly higher, which means that other unknown factors are predominant in the scenario of this disease in Afro-descendants.

The frequency of HLA-C1/C2 did not differ between patients and controls, but significant associations were found regarding the Bw4 ligands (Table 3). It is noteworthy that, besides the differential susceptibility to PF being strongly associated with HLA class II genes [6,7], this is the first study reporting significant association between this disease and the class I genes. The Bw4 epitope was found negatively associated with PF, in agreement with the negative association observed for its cognate activating *KIR3DS1* receptor. Therefore, the susceptibility conferred by the presence of Bw6 could be interpreted, in this context, as simple consequence of the absence of Bw4. We cannot discard, however, the possibility of Bw6 acting in a direct susceptibility role. Due its weak binding to its receptor, [18,19] the stronger association of Bw4(80T) than Bw4(80I) could be an evidence that the KIR binding is not the only reason for this epitope being associated. Although we do not know if *HLA-A* and *B* have other implications in PF pathogenesises beyond KIR recognition, a careful search for allelic association of these loci should be performed.

Combinations *KIR*+HLA also exhibited significant differences between patients and controls (Figure 4). The presence both *KIR3DS1* and Bw4 showed stronger association than each one separately, which may corroborate that the activating function may be, in fact, the major factor interfering in the PF pathogenesis. Interestingly, the strongest negative association between *KIR*+HLA combinations was found for *KIR3DS1*+HLA-Bw4(80T). There are clear evidences that HLA-Bw4(80I) is powerfully recognized by KIR3DL1 and its homologue KIR3DS1[18,19,21]. Nevertheless, the isoleucine at position 80 is not essential for this interaction [37] and the studies performed have regarded mainly KIR3DL1 activity, being the comparisons between the KIR3DS1 ability of distinguishing both Bw4 ligands not well explored. This findings show that Bw4(80T) may also be important as a KIR3DS1 ligand, even being less strongly recognized.

The less significant negative association between pairs *KIR3DL1*+Bw4 may result from the high frequency of *KIR3DL1* in the population, which means that the association values are explained by the Bw4 epitope frequencies only.

*KIR* activating genes, their HLA ligands and combinations of both appear to be protective in the context of PF etiology. This association may be related with the contribution of infectious agents to the pathogenesis of this disease. NK cells have been demonstrated as important for autoreactivity and also have been implicated in several autoimmune diseases. Understanding how those cells and their receptors influence the immune response could be a key for the comprehension of one face of the autoimmune complexity.

## Materials and Methods

We analyzed 233 patients and 204 controls without history of the disease. The majority of the patients were contacted at Hospital Adventista do Pênfigo, Campo Grande, MS, Brazil. All individuals voluntarily agreed to participate and written informed consent was obtained from all participants. This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Parana, in accordance with Brazilian Federal laws. The individuals were separated in two groups, according to their predominant ancestry: Euro-descendants (Euro) and Afro-descendants (Afro). The reason of this subdivision is because different populations may differ in allele frequencies. Although this subdivision is arbitrary, this approach was validated by population genetic studies, which showed that the distribution of alleles known to be restricted to populations autochthonous from one continent follows a gradient among the population strata, as expected if the classification discriminated the strata according to relative contributions of the ancestral population [38,39]. When the frequencies between Euro-descendants and Afro-descendants did not differ statistically, they were analyzed as a single population sample, because the total sample may give us a better representation of the whole population.

The *KIR* genotyping was performed by the PCR-SSP multiplex method [40] using two pairs of primers for each gene. For *KIR2DL2* and *2DL3*, an additional pair of primers for each gene [41] was included to confirm the results. A subset (163 patients and 124 controls) was genotyped for HLA class I applying the LABType® SSO reagent kits (One Lambda, USA).

Frequencies of *KIR* genes and haplogroups were obtained by direct counting. Tests of population differentiation were performed by analyzes of 2x2 contingency tables, calculating the exact p value by the metropolis algorithm. The p value of 0.05 was adopted as the

significance limit. The Mantel-Haenszel method [42] applied for calculating the odds ratio (OR) and the 95% confidence intervals. Logistic regression analyzes were carried out by IBM® SPSS® Statistics software.

## **Acknowledgments**

We are thankful to all the staff of Hospital Adventista do Penfigo, in special, to Marley Cafaro, for the friendly collaboration and hospitality. Thanks to all patients and controls who voluntarily participate of this work and all staff of Laboratory of Human Molecular Genetics at the Federal University of Paraná for assistance and support. Also thanks to Liana Alves de Oliveira and Eleidi Chautard Freire-Maia for helpful advice. This project received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX, Institutos do Milênio, Fundação Araucária, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## References

1. Chidgey M (2002) Desmosomes and disease: an update. *Histol Histopathol* 17: 1179-1192.
2. Sampaio SA, Rivitti EA, Aoki V, Diaz LA (1994) Brazilian pemphigus foliaceus, endemic pemphigus foliaceus, or fogo selvagem (wild fire). *Dermatol Clin* 12: 765-776.
3. Hans-Filho G, dos Santos V, Katayama JH, Aoki V, Rivitti EA, et al. (1996) An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. *J Invest Dermatol* 107: 68-75.
4. Aoki V, Millikan RC, Rivitti EA, Hans-Filho G, Eaton DP, et al. (2004) Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Invest Dermatol Symp Proc* 9: 34-40.
5. Sekiguchi M, Futei Y, Fujii Y, Iwasaki T, Nishikawa T, et al. (2001) Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. *J Immunol* 167: 5439-5448.
6. Petzl-Erler ML, Santamaria J (1989) Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? *Tissue Antigens* 33: 408-414.
7. Pavoni DP, Roxo VM, Marquart Filho A, Petzl-Erler ML (2003) Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. *Genes Immun* 4: 110-116.
8. Pereira NF, Hansen JA, Lin MT, Roxo VM, Braun K, et al. (2004) Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. *Cytokine* 28: 233-241.
9. Petzl-Erler ML, Malheiros D (2005) Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: is there any relationship? *J Autoimmun* 25: 121-125.
10. Pincerati MR, Dalla-Costa R, Petzl-Erler ML (2010) CTLA4CT60 gene polymorphism is not associated with differential susceptibility to pemphigus foliaceus. *Genet Mol Biol* 33: 442-444.
11. Pavoni DP, Cerqueira LB, Roxo VM, Petzl-Erler ML (2006) Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *Braz J Med Biol Res* 39: 1227-1232.
12. Malheiros D, Petzl-Erler ML (2009) Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. *Genes Immun* 10: 547-558.
13. Parham P (2005) Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 42: 459-462.



14. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N (1998) Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 161: 571-577.
15. Chewning JH, Gudme CN, Hsu KC, Selvakumar A, Dupont B (2007) KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol* 179: 854-868.
16. Foley B, De Santis D, Lathbury L, Christiansen F, Witt C (2008) KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. *Int Immunol* 20: 555-563.
17. Thananchai H, Gillespie G, Martin MP, Bashirova A, Yawata N, et al. (2007) Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol* 178: 33-37.
18. Carr WH, Pando MJ, Parham P (2005) KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* 175: 5222-5229.
19. Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, Colonna M (1994) NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med* 180: 1235-1242.
20. Augusto DG, Zehnder-Alves L, Pincerati MR, Martin MP, Carrington M, et al. (2012) Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population. *Immunogenetics* 64: 143-152.
21. Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, et al. (2007) Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med* 204: 3027-3036.
22. von Bubnoff D, Andres E, Hentges F, Bieber T, Michel T, et al. (2010) Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol* 125: 60-68.
23. Takahashi H, Amagai M, Tanikawa A, Suzuki S, Ikeda Y, et al. (2007) T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 127: 324-330.
24. Stern JN, Keskin DB, Barteneva N, Zuniga J, Yunis EJ, et al. (2008) Possible role of natural killer cells in pemphigus vulgaris - preliminary observations. *Clin Exp Immunol* 152: 472-481.
25. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M (2008) The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol* 20: 343-352.
26. Uhrberg M, Parham P, Wernet P (2002) Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 54: 221-229.

27. Yusa S, Catina TL, Campbell KS (2002) SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J Immunol* 168: 5047-5057.
28. Faure M, Long EO (2002) KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 168: 6208-6214.
29. Kikuchi-Maki A, Yusa S, Catina TL, Campbell KS (2003) KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J Immunol* 171: 3415-3425.
30. Trundley AE, Hiby SE, Chang C, Sharkey AM, Santourlidis S, et al. (2006) Molecular characterization of KIR3DL3. *Immunogenetics* 57: 904-916.
31. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, et al. (2002) Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 169: 5118-5129.
32. Parham P (2004) Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett* 92: 11-13.
33. van der Slik AR, Alizadeh BZ, Koeleman BP, Roep BO, Giphart MJ (2007) Modelling KIR-HLA genotype disparities in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 69 Suppl 1: 101-105.
34. Shi FD, Wang HB, Li H, Hong S, Taniguchi M, et al. (2000) Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol* 1: 245-251.
35. Eaton DP, Diaz LA, Hans-Filho G, Santos VD, Aoki V, et al. (1998) Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. *J Med Entomol* 35: 120-131.
36. Schleinitz N, Vely F, Harle JR, Vivier E (2010) Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 131: 451-458.
37. Gumperz JE, Barber LD, Valiante NM, Percival L, Phillips JH, et al. (1997) Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor. *J Immunol* 158: 5237-5241.
38. Braun-Prado K, Vieira Mion AL, Farah Pereira N, Culpi L, Petzl-Erler ML (2000) HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue Antigens* 56: 417-427.
39. Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, de ODMM, Visentainer JE, et al. (2000) HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. *Hum Biol* 72: 597-617.

40. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M (2010) KIR genotyping by multiplex PCR-SSP. *Methods Mol Biol* 612: 365-375.
41. Vilches C, Castano J, Gomez-Lozano N, Estefania E (2007) Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens* 70: 415-422.
42. Mantel N, Haenszel W (1959) Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 22: 719-748.
43. Kimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, Kiyohara C, Mitoma H, et al. (2010) Association of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5 with systemic lupus erythematosus and accompanying infections. *Rheumatology (Oxford)* 49: 1346-1353.
44. Pellett F, Siannis F, Vukin I, Lee P, Urowitz MB, et al. (2007) KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma. *Tissue Antigens* 69 Suppl 1: 106-108.
45. Tajik N, Shahsavar F, Poormoghim H, Radjabzadeh MF, Mousavi T, et al. (2011) KIR3DL1+HLA-B Bw4Ile80 and KIR2DS1+HLA-C2 combinations are both associated with ankylosing spondylitis in the Iranian population. *Int J Immunogenet* 38: 403-409.
46. Jiao YL, Ma CY, Wang LC, Cui B, Zhang J, et al. (2008) Polymorphisms of KIRs gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing spondylitis: possible association with susceptibility to the disease. *J Clin Immunol* 28: 343-349.
47. Garcia-Leon JA, Pinto-Medel MJ, Garcia-Trujillo L, Lopez-Gomez C, Oliver-Martos B, et al. (2011) Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Spanish multiple sclerosis patients. *Mol Immunol* 48: 1896-1902.
48. Williams F, Meenagh A, Sleator C, Cook D, Fernandez-Vina M, et al. (2005) Activating killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 is associated with psoriatic arthritis. *Hum Immunol* 66: 836-841.
49. Martin MP, Nelson G, Lee JH, Pellett F, Gao X, et al. (2002) Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 169: 2818-2822.
50. Nikitina-Zake L, Rajalingham R, Rumba I, Sanjeevi CB (2004) Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Latvian patients with type 1 diabetes mellitus and healthy controls. *Ann N Y Acad Sci* 1037: 161-169.
51. Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, et al. (2001) Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 193: 1159-1167.
52. Luszczek W, Manczak M, Cislo M, Nockowski P, Wisniewski A, et al. (2004) Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol* 65: 758-766.

53. Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, Ishikawa K, Yoshikawa Y, et al. (2004) Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 122: 1133-1136.
54. Karlsen TH, Boberg KM, Olsson M, Sun JY, Senitzer D, et al. (2007) Particular genetic variants of ligands for natural killer cell receptors may contribute to the HLA associated risk of primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 46: 899-906.

**Table 1** Genetic association between pemphigus foliaceus and five *KIR* genes.

Gene		Patients		Controls		<i>P</i>	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>
		<i>n</i>	<i>f</i> (%)	<i>n</i>	<i>f</i> (%)			
<b>2DS1</b>	Euro	45	31.5	65	49.62	0.002	0.46	0.28 - 0.76
	Afro	35	38.9	31	43.06	0.590	0.84	0.44 - 1.58
	Total	80	34.3	96	47.29	0.005	0.58	0.39 - 0.85
<b>2DS3</b>	Euro	27	18.8	44	33.85	0.004	0.45	0.26 - 0.78
	Afro	20	27.4	30	33.71	0.386	0.74	0.38 - 1.46
	Total	47	21.7	74	33.79	0.005	0.54	0.35 - 0.83
<b>3DS1</b>	Euro	42	29.6	58	44.27	0.011	0.54	0.33 - 0.89
	Afro	36	40.4	28	38.36	0.791	1.09	0.58 - 2.06
	Total	78	33.8	86	42.16	0.071	0.69	0.47 - 1.03
<b>2DL5</b>	Euro	65	45.1	81	62.31	0.004	0.49	0.30 - 0.87
	Afro	55	61.8	41	54.67	0.356	1.34	0.72 - 2.50
	Total*	-	-	-	-	-	-	-
<b>3DL1</b>	Euro	135	93.8	116	88.55	0.126	1.93	0.81 - 4.60
	Afro	84	94.4	64	87.67	0.130	2.35	0.75 - 7.39
	Total	219	94.0	180	88.24	0.033	2.1	1.05 - 4.15

Only genes which presented significant ( $P < 0.05$ ) genetic association in at least one population sample are shown. Euro = predominantly European background; Afro = mixed subsample, with African background; Total = total sample. \* Frequencies between Euro and Afro differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Table 2** The A/A genotype is associated to increased susceptibility to pemphigus foliaceus.

Genotypes		Patients		Controls		<i>P</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI</i>
		<i>n</i>	<i>f</i> (%)	<i>n</i>	<i>f</i> (%)			
AA	Euro	50	34.5	27	20.1	0.007	2.08	1.21 - 3.60
	Afro	25	27.8	18	25.0	0.689	1.15	0.57 - 2.34
	Total	75	31.9	45	21.8	0.017	1.67	1.09 - 2.58
Bx	Euro	95	65.5	107	79.9	0.007	0.48	0.28 - 0.83
	Afro	65	72.2	54	75.0	0.689	0.87	0.43- 1.75
	Total	160	68.1	161	78.2	0.017	0.59	0.38 - 0.92

Euro = predominantly European background; Afro: mixed subsample, with African background; Total = total sample.

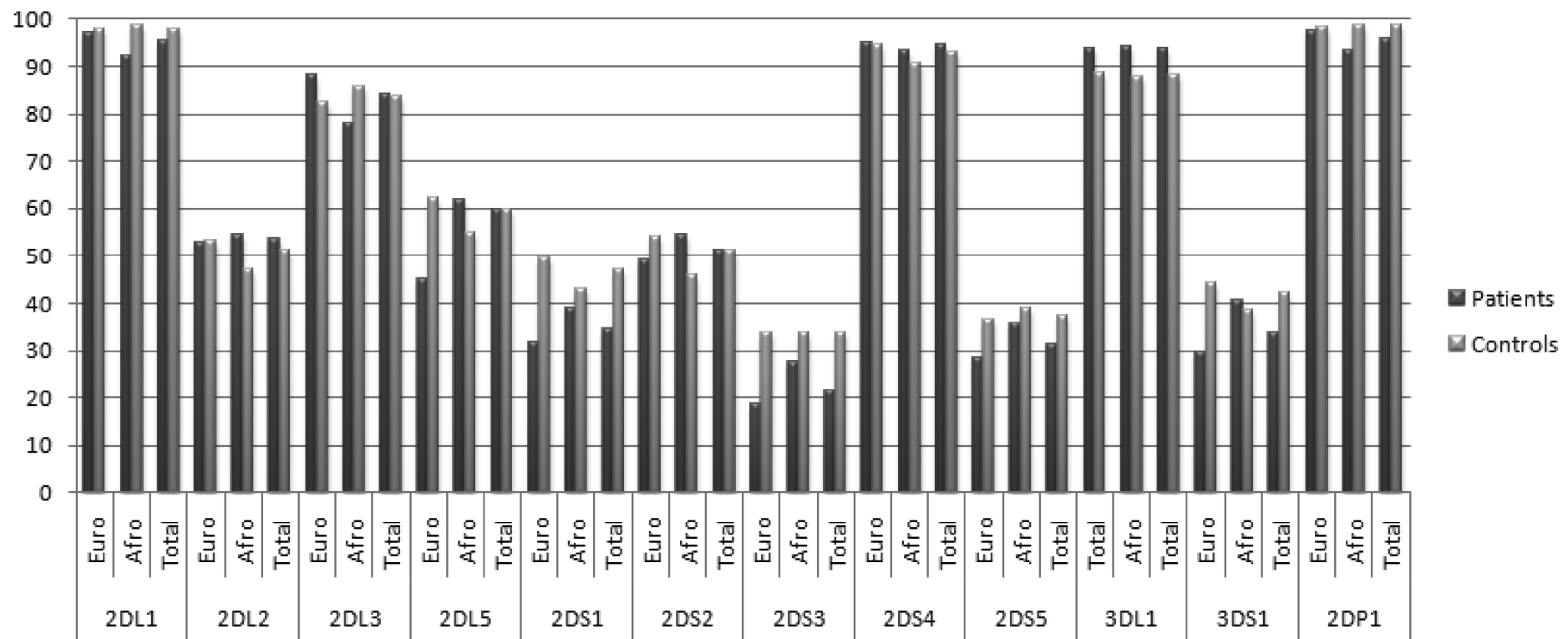
**Table 3** Association analyzes between pemphigus foliaceus and HLA ligands of KIR.

KIR Ligands		Patients		Controls		<i>P</i>	<i>OR</i>	<i>95% CI</i>
		<i>n</i>	<i>f (%)</i>	<i>n</i>	<i>f (%)</i>			
<b>C1</b>	Euro	58	75.3	63	81.8	0.327	1.47	0.68 - 3.21
	Afro	30	63.8	35	74.5	0.263	1.63	0.25 - 1.47
	Total	88	71.0	98	79.0	0.143	1.63	0.36 - 1.26
<b>C2</b>	Euro	55	71.4	52	67.5	0.597	1.20	0.60 - 2.39
	Afro	35	68.6	33	70.2	0.862	1.63	0.39 - 2.19
	Total	90	70.3	85	68.5	0.764	1.09	0.64 - 1.86
<b>Bw4*</b>	Euro	64	64.6	56	78.9	0.045	0.49	0.24 - 0.99
	Afro	42	65.6	22	83.3	0.045	0.38	0.15 - 0.99
	Total	106	65.0	57	80.5	0.005	0.45	0.26 - 0.79
<b>Bw4 80I</b>	Euro	57	57.6	47	65.3	0.307	0.72	0.38 - 1.35
	Afro	38	59.4	30	71.4	0.210	0.58	0.25 - 1.34
	Total	95	58.3	77	67.5	0.110	0.45	0.41 - 1.11
<b>Bw4 80T</b>	Euro	15	15.3	16	24.2	0.150	0.56	0.26 - 1.24
	Afro	5	8.2	14	34.1	0.001	0.17	0.06 - 0.53
	Total	20	12.6	30	28.0	0.001	0.37	0.20 - 0.69
<b>Bw6</b>	Euro	91	94.8	57	86.4	0.060	2.87	0.92 - 9.01
	Afro	58	95.1	30	73.2	0.001	7.09	1.84 - 27.04
	Total	149	94.9	20	81.3	<10 <sup>-3</sup>	4.28	1.81 - 10.13

Euro = predominantly European background; Afro = mixed subsample, with African background; Total = total sample. \* at least one Bw4 epitope (80I from both A or B loci or 80T).

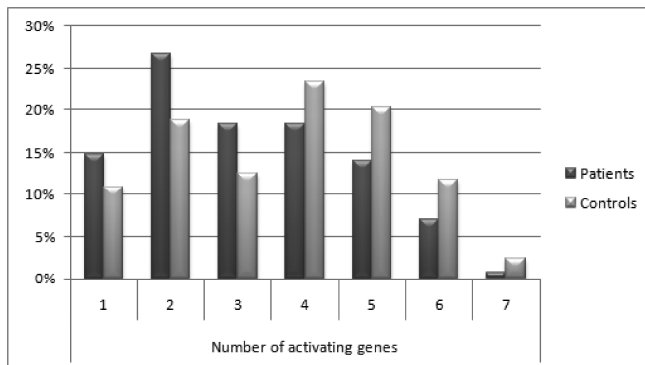




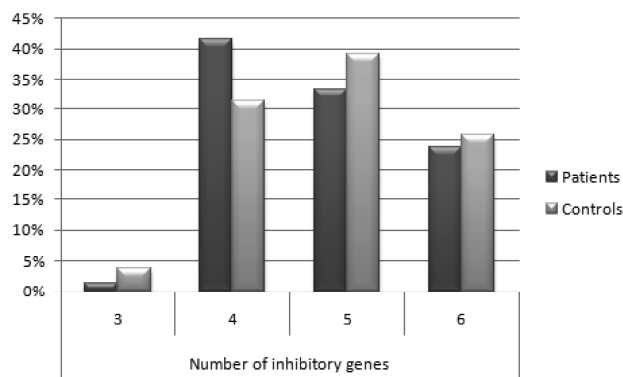


**Figure 1 Frequencies of KIR genes in patients and controls.** Euro = predominantly European background; Afro = mixed subsample, with African background; Total = total sample. Framework genes – *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* and *KIR3DP1* – present in all individuals are not shown. All gene frequencies are shown in Supplementary table 1.

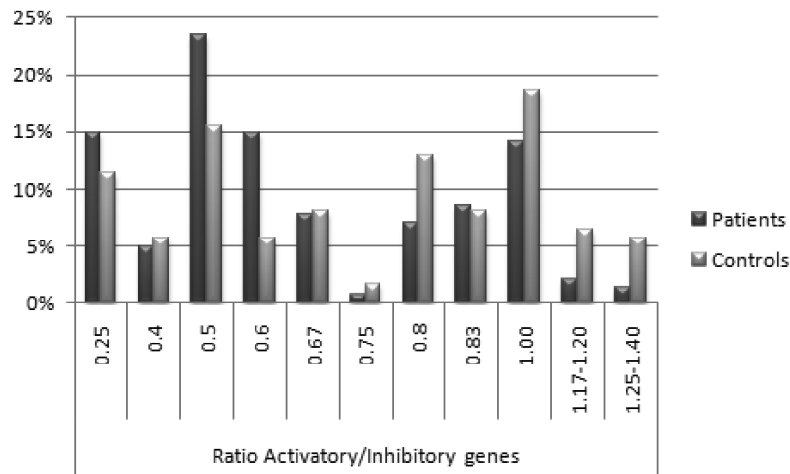
A



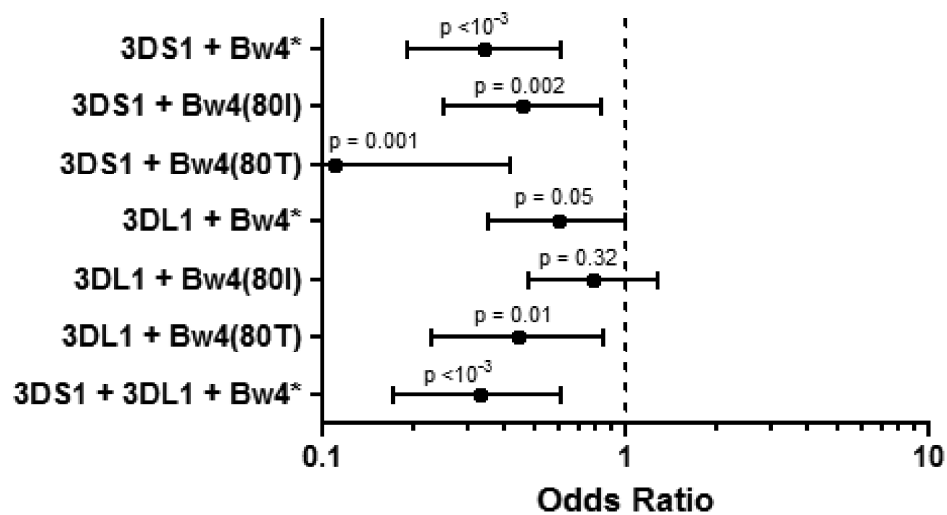
B



**Figure 2 Frequency of the number of activating and inhibitory *KIR* genes in patients and controls.** Only the Euro population was considered. **(A)** *KIR2DL4* was counted as activating gene and the deleted *KIR2DS4* was not counted as activating or inhibitory. Significant negative association was found for the presence of more than 3 activating genes (OR = 0.49; 95% CI=0.30 - 0.79;  $p = 0.003$ ). **(B)** *KIR3DL3* was not included as inhibitory.



**Figure 3 High activating/inhibitory genes ratio is protective.** Only the Euro-descendant population sample was considered. *KIR2DL4* was counted as activating and *KIR3DL3* was not included as inhibitory. Deleted *KIR2DS4* was not counted as activating or inhibitory. Significant negative association was found for the ratio higher than 0.75 (OR = 0.44; 95% 95% CI = 0.27–0.73;  $p = 0.001$ )



**Figure 4 Association analyzes for the combinations KIR x HLA ligands.** The bars indicate the 95% confidence interval and the black spot indicates the OR. The results for the total sample are shown. The results for the two population strata and the complete information about KIR and HLA combinations are found in Supplementary Table 1. \* at least one Bw4 epitope (80I from both A or B loci or 80T).

**Supplementary table 1** Frequencies of *KIR* in patients and controls

Gene	Population	Patients		Controls	
		<i>f</i> (%)	<i>f</i> G	<i>f</i> (%)	<i>f</i> G
<b><i>KIR2DL1</i></b>	Euro	97.3	0.83	97.7	0.85
	Afro	92.3	0.72	98.6	0.88
	Total	95.4	0.78	98.0	0.86
<b><i>KIR2DL2</i></b>	Euro	52.8	0.31	53.1	0.32
	Afro	54.4	0.33	47.1	0.27
	Total	53.4	0.32	51.0	0.30
<b><i>KIR2DL3</i></b>	Euro	88.2	0.66	82.3	0.58
	Afro	77.8	0.53	85.7	0.62
	Total	84.2	0.60	83.5	0.59
<b><i>KIR2DL4</i></b>	Euro	100.0	1.00	100.0	1.00
	Afro	100.0	1.00	100.0	1.00
	Total	100.0	1.00	100.0	1.00
<b><i>KIR2DL5</i></b>	Euro	45.1	0.26	62.3	0.39
	Afro	61.8	0.38	54.7	0.33
	Total	59.5	0.36	59.5	0.36
<b><i>KIR2DS1</i></b>	Euro	31.5	0.17	49.6	0.29
	Afro	38.9	0.22	43.1	0.25
	Total	34.3	0.19	47.3	0.27
<b><i>KIR2DS2</i></b>	Euro	49.3	0.29	53.8	0.32
	Afro	54.2	0.32	45.7	0.26
	Total	51.1	0.30	51.0	0.30
<b><i>KIR2DS3</i></b>	Euro	18.8	0.10	33.8	0.19
	Afro	27.4	0.15	33.7	0.19
	Total	21.7	0.11	33.8	0.19
<b><i>KIR2DS4</i></b>	Euro	95.1	0.78	94.7	0.77
	Afro	93.3	0.74	90.4	0.69
	Total	94.4	0.76	93.2	0.74
<b><i>KIR2DS5</i></b>	Euro	28.5	0.15	36.6	0.20
	Afro	35.6	0.20	38.9	0.22
	Total	31.2	0.17	37.4	0.21
<b><i>KIR3DL1</i></b>	Total	93.8	0.75	88.5	0.66
	Afro	94.4	0.76	87.7	0.65
	Total	94.0	0.75	88.2	0.66
<b><i>KIR3DL2</i></b>	Euro	100.0	1.00	100.0	1.00
	Afro	97.8	1.00	100.0	1.00
	Total	99.1	1.00	100.0	1.00
<b><i>KIR3DL3</i></b>	Euro	100.0	1.00	100.0	1.00
	Afro	100.0	1.00	100.0	1.00
	Total	100.0	1.00	100.0	1.00
<b><i>KIR3DS1</i></b>	Euro	29.6	0.16	44.3	0.25
	Afro	40.4	0.23	38.4	0.21
	Total	33.8	0.19	42.2	0.24
<b><i>KIR2DP1</i></b>	Euro	97.3	0.84	98.5	0.88
	Afro	93.3	0.74	98.6	0.88
	Total	95.8	0.80	98.5	0.88
<b><i>KIR3DP1</i></b>	Euro	100.0	1.00	100.0	1.00
	Afro	100.0	1.00	100.0	1.00
	Total	100.0	1.00	100.0	1.00

*f* = carrier frequency; *f*G = gene frequency

**Supplementary Table 2** Association analyzes for the combinations KIR x HLA ligands

KIR Ligands		Patients		Controls		P	OR	95% CI
		n	F (%)	n	F(%)			
<b>3DS1 + Bw4*</b>	Euro	12	11.9	26	37.7	$<10^{-3}$	0.22	0.10 - 0.48
	Afro	14	22.6	13	31.7	0.300	0.62	0.25 - 1.52
	Total	26	16.0	39	35.5	$<10^{-3}$	0.34	0.19 - 0.61
<b>3DS1 + Bw4(80I)</b>	Euro	12	11.9	21	30.4	0.002	0.31	0.14 - 0.68
	Afro	14	22.6	11	26.2	0.610	0.79	0.31 - 1.96
	Total	26	16.0	32	28.8	0.008	0.46	0.25 - 0.83
<b>3DS1 + Bw4(80T)</b>	Euro	1	1.0	9	13.4	0.001	0.07	0.008 - 0.54
	Afro	2	3.3	6	15.0	0.030	0.19	0.03 - 1.00
	Total	3	1.9	15	14.0	$<10^{-3}$	0.11	0.03 - 0.42
<b>3DL1 + Bw4*</b>	Euro	62	61.4	48	70.6	0.220	0.66	0.34 - 1.28
	Afro	40	63.5	32	78.0	0.110	0.49	0.20 - 1.20
	Total	102	62.2	80	73.4	0.050	0.60	0.35 - 1.0
<b>3DL1 + Bw4(80I)</b>	Euro	55	54.5	40	58.8	0.837	0.84	0.45 - 1.56
	Afro	36	57.1	27	65.9	0.690	0.69	0.31 - 1.56
	Total	91	55.5	67	61.5	0.320	0.78	0.48 - 1.28
<b>3DL1 + Bw4(80T)</b>	Euro	15	14.9	14	20.6	0.330	0.67	0.30 - 1.50
	Afro	5	7.9	12	29.3	0.004	0.21	0.07 - 0.65
	Total	20	12.2	26	23.9	0.010	0.44	0.23 - 0.84
<b>3DS1 + 3DL1 + Bw4*</b>	Euro	9	8.9	21	30.9	$<10^{-3}$	0.22	0.09 - 0.51
	Afro	11	18.3	12	29.3	0.190	0.54	0.21 - 1.38
	Total	20	12.2	33	30.3	$<10^{-3}$	0.33	0.17 - 0.61

\* at least one Bw4 epitope (80I from both A or B loci or 80T)

# ***KIR3DL2* high resolution allele typing by the sequence-based typing (SBT) method**

Danillo G. Augusto<sup>1</sup>; Patricia M. Martin<sup>2</sup>; Fuh-Mei Duh<sup>2</sup>; Mary Carrington<sup>2,3</sup> and Maria Luiza Petzl-Erler<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná

<sup>2</sup>Cancer and Inflammation Program, Laboratory of Experimental Immunology, SAIC-Frederick, Inc., NCI-Frederick, Frederick, MD 21702, USA

<sup>3</sup>Ragon Institute of Massachusetts General Hospital, Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Boston, MA 02114, USA

**Running title:** *KIR3DL2* high resolution typing

**Corresponding author:**

Prof. Dr. Maria Luiza Petzl-Erler  
Departamento de Genética  
Universidade Federal do Paraná  
Caixa Postal 19071  
81531-990 Curitiba, Brazil  
Tel: (+5541) 33611746; 33611724  
Fax: (+5541) 33611793  
e-mail: danillo@ufpr.br; perler@ufpr.br

## **Abstract**

*KIR3DL2* is one of the most polymorphic inhibitory killer cell immunoglobulin-like (KIR) genes, thought to interact with some HLA-A allotypes and also to participate of the antimicrobial response by binding microbial CpG oligodeoxynucleotides at the cell surface and delivering them to the early endosomes where they can bind to toll like receptor 9 (TLR9). The polymorphism of several KIR genes, including *KIR3DL2*, has been associated to complex diseases. Though, the allele diversity of these genes is still poorly characterized. We describe a sequence-based typing (SBT) method, which associated to sequence-specific priming in the polymerase chain reaction (PCR-SSP), may distinguish most of the described alleles and identify still undescribed alleles.

**Key words:** *KIR*, *KIR3DL2*, *3DL2*, alleles, polymorphism, DNA sequencing

## Introduction

The *killer-cell immunoglobulin-like (KIR)* genes are highly polymorphic in gene content (presence/absence) as well as for the allelic polymorphism (Wilson et al., 2000; Shilling et al., 2002). To date, the mostly polymorphic gene seems to be *KIR3DL3*, which has more than 100 alleles described (Robinson et al., 2010). Yet, while the *KIR* gene content has been analyzed in many populations, the allelic polymorphism is still not well known for the majority of the 15 genes and 2 pseudogenes.

*KIR* receptors are of crucial importance for the modulation of immune responses, especially the activity of the natural killer (NK) cells. Information about the ligands of several of the *KIR* receptors is still lacking, but for some *KIR* the recognition of HLA class I molecules has been well established (Jamil and Khakoo, 2011). The *KIR3DL2* receptor is thought to recognize as ligands certain HLA-A allotypes (Hansasuta et al., 2004). Recently, Sivori et al. (2010) reported that this gene also participates in the antimicrobial response recognizing and sending microbial CpG oligodeoxynucleotides to toll like receptors. Understanding the *KIR* allelic diversity is mandatory for a detailed analysis of how the interactions between these receptors and their ligands result in differences of their functional effects between individuals with different genotypes, which, although being subtle, may have a significant impact on the outcome of the immune response.

More than 80 alleles have been described for *KIR3DL2*, among which many are still unconfirmed (Robinson et al., 2010). The *KIR3DL2* receptor is coded by the longest gene in the *KIR* family, composed by 9 exons and comprising 16.7 kb. The most polymorphic exons, 3, 4 and 5 correspond to the three extracellular domains (D0, D1 and D2 respectively) which can recognize the HLA molecules. The microbial CpG oligodeoxynucleotides are recognized by the D0 domain (Sivori et al., 2010). The figure 1 shows all the *KIR3DL2* exons and the corresponding domains in the mature protein. *KIR3DL2* is the gene at the most telomeric region of the *KIR* gene cluster and is present in virtually all haplotypes, therefore being considered a framework gene (Martin et al., 2000, Hsu et al., 2002).

The similarity between the gene sequences of the different *KIR* genes results in difficulties for *KIR* genotyping and careful analysis is necessary to design specific primers in order to avoid coamplification of the homologous genes.

Here we describe a sequence based typing (SBT) method for high resolution *KIR3DL2* typing, which can recognize the majority of the described alleles and identify still



unrecognized alleles. Because it is not always possible to know the gametic phase of the mutations, we also developed a set of primers for allele specific PCR-SSP, which can resolve some of the most frequent ambiguities. This method can distinguish most of the alleles at high resolution and is based on the amplification and sequencing of only four small amplicons. The exons 3, 4, 5, 7, 8, 9 and also intron 7 are sequenced. The individuals have to be tested initially for the presence of *KIR3DL2* by a formerly reported method (Martin and Carrington, 2008; Kulkarni et al., 2010).

## Materials

### *PCR amplifications*

1. Good quality DNA from isolated cells, peripheral blood or other tissues at a concentration of 20ng/μl.
2. Oligonucleotide primers for each exon (see table 1 for sequences and PCR conditions).
3. 50 mM MgCl<sub>2</sub>.
4. dNTP mix: 25 mM each of dATP, dTTP, dGTP, and dCTP.
5. 10× PCR buffer: 200 mM Tris–HCl, pH 8.4, and 500 mM KCl.
6. Taq DNA polymerase (note 1).
7. 96-well PCR plates.
8. Mono and multichannel pipettors (8 channels).

### *Gel electrophoresis*

1. Orange G loading buffer: 0.5% Orange G, 20% Ficoll, and 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).
2. 10× TAE electrophoresis buffer: 400 mM Tris, 200 mM acetic acid, and 10 mM EDTA.
3. 100 bp DNA ladder.
4. Electrophoresis grade agarose.
5. Horizontal electrophoresis chamber.
6. Gel casting tray combs having teeth appropriately spaced to allow for loading with a multichannel pipettor.
7. 10 mg/ml ethidium bromide solution.
8. High-voltage power supply.

9. Photographic means of gel documentation (ultraviolet light source, camera).

#### *PCR products purification*

1. AGENCOURT® AMPURE®XP PCR Purification (note 2).
2. 96-well PCR plates.
3. Robotic platform (note 3).

#### *Sequencing reaction*

1. Purified PCR products.
2. Sequencing primer (10mM).
3. Big Dye® terminator kit, Applied Biosystems.
4. 5X Buffer (Big Dye® kit).
5. Ultrapure water.

#### *Sequencing reaction products purification*

1. AGENCOURT® CLEANSEQ® Dye-Terminator Removal.
2. 96-well PCR plates.
3. Robotic platform (note 4).

#### *Ambiguities solving by PCR-SSP*

1. Good quality DNA from isolated cells, peripheral blood or other tissues at a concentration of 20ng/μl (note 5).
2. Specific primers for each allele of ambiguities (see table 2) 50 mM MgCl<sub>2</sub>.
3. dNTP mix: 25 mM each of dATP, dTTP, dGTP, and dCTP.
4. 10× PCR buffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8.4, and 500 mM KCl.
5. Taq DNA polymerase.
6. 96-well PCR plates.
7. Mono and multichannel pipettors (8 channels).

## Methods

### *PCR*

1. Disperse 1µl of the DNA solution in each well.
2. Prepare the PCR cocktail for each amplification (see primers in Table 1A). Add 7µl of ultrapure water, 1µl of 10x buffer, 0.3µl of dNTP mix (25mM), 0.2µl of each specific primer, 0.1µl of Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen). Mix well by vortexing at low speed.
3. Dispense 9µl of the PCR cocktail for each DNA sample in the plate for a total PCR reaction volume of 10µl.
4. Cover the plate with acetate film and centrifuge it briefly to pull the contents to the bottom of the wells.
5. The amplification is carried out in a programmable PCR thermal cycler with heated lid to minimize evaporation.
6. PCR programs: For exon 3 – 3 min at 94°C, 5 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 65°C 30 s at 72°C, 26 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 62°C 30 s, 4 cycles of 15 s at 94°C, 60 s at 55°C 60 s at 72°C followed by a final 7 min extension step at 72°C; For exon 5 – 3 min at 94°C, 35 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 65°C 30 s at 72°C followed by a final 7 min extension step at 72°C; For exons 4 and 7-9 – 3 min at 94°C, 5 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 65°C 30 s at 72°C, 26 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 60°C 30 s, 4 cycles of 15 s at 94°C, 60 s at 55°C 60 s at 72°C followed by a final 7 min extension step at 72°C

### *Agarose Gel Electrophoresis*

1. For one gel, prepare 150 ml of 1.5 - 2% w/v agarose in 1× TAE buffer by heating until the agarose is completely solubilized.
2. Cool the mixture to 65°C and add 5µl ethidium bromide and gently mix to avoid bubble formation.
3. Pour the gel mixture into the gel casting tray and insert the 50-well combs. Allow the gel to solidify (~20 min).
4. Submerge the solidified gel in the electrophoresis chamber filled with 800 ml of 1× TAE buffer. Remove the combs.
5. Load 2µl of the 100 bp DNA ladder to the first and last wells of each row.
6. Mix 2µl of Orange G loading buffer with 2µl of PCR product.

7. Using an 8 or 12-channel pipettor, load the 4µl of the Orange G buffer mixed with each PCR product into the wells of the gel.
8. Electrophorese for 45 min at 100 V.
9. Visualize the bands corresponding to the PCR products using a UV light source and photograph the gel for a permanent record.

#### *PCR products purification*

1. Follow the online instructions available at: <http://www.agencourt.com/technical>.

#### *Ambiguities*

1. Select those individuals having ambiguous genotyping results.
2. Disperse 1µl of DNA in each well.
3. Prepare the PCR cocktail for each amplification (see primers in Table 1B). Add 7µl of ultrapure water, 1µl of 10x buffer, 0.3µl of dNTP mix (25mM), 0.2µl of each specific primer, 0.1µl of Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen). Mix well by vortexing at low speed.
4. Dispense 9µl of the PCR cocktail for each DNA sample in the plate for a total PCR reaction volume of 10µl.
5. Cover the plate with acetate film and centrifuge it briefly to pull the contents o the bottom of the wells. The amplification is carried out in a programmable PCR thermal cyclor with heated lid to minimize evaporation.
6. PCR programs. For alleles *KIR3DL2\*002*, *KIR3DL2\*007* and *KIR3DL2\*015*: 3 min at 94°C, 35 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 66°C 45 s at 72°C followed by a final 7 min extension step at 72°C; For allele *KIR3DL2\*010*: 3 min at 94°C, 35 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 68°C 45 s at 72°C followed by a final 7 min extension step at 72°C.
7. The agarosis gel and the electrophoreses should be prepared and performed as described above.

#### *Sequencing reaction*

1. Prepare the sequencing reaction cocktail: 4.675µl of ultrapure water, 0.25µl of Big Dye terminator (Applied Biosystems), 1.875µl of 5X buffer (Big Dye® kit) and 0.2µl of

sequencing primer (10mM). The sequencing primers are the same used for amplification (Table 1)

2. Vortex briefly and fast spin centrifuge to pull the contents to the bottom of the tube.
3. Disperse 7µl of sequencing cocktail in each well
4. Disperse 3µl of each purified PCR product in each well
5. Cover the plate with acetate film and centrifuge briefly to pull the contents to the bottom of the wells
6. The sequencing amplification program is 96°C for 10 sec, 50°C for 10 sec, 60°C for 2 min

#### *Sequence reaction products purification*

1. Follow the online instructions available at: <http://www.agencourt.com/technical>

## **Interpretation**

### *Sequencing data*

Each sequence has to be carefully analyzed individually by a specialized software. We suggest Mutation Surveyor® (Softgenetics). All detect polymorphisms must be annotated after confirmation. To interpret the sequences and possible genotypes, the dbLRC website may be used (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/lrc/>). Consulting the sequences alignments available on IPD (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>) is strongly recommended. New polymorphisms have to be sequenced at least twice, from different PCR reactions.

Even for those individuals who apparently lack the *KIR3DL2* gene, as evidenced by the gene content typing performed in advance to the SBT method here described, the amplification and sequencing should be done. There is the variant called *3DL1/v2*, a hybrid allele whose telomeric portion corresponds to *KIR3DL2* and centromeric portion corresponds to *KIR3DL1* (Norman et al., 2009). Applying most of the *KIR* gene content typing protocols, including the ones which we suggested (Martin and Carrington, 2008; Kulkarni et al., 2010), this variant will be misinterpreted as absence of *KIR3DL2*. For those individuals, all exons will be successful amplified and sequenced, but the exons 3, 4 and 5 will match to *KIR3DL1* sequence and only the telomeric region (exons 7-9) will match to *KIR3DL2*. Therefore, all

*KIR3DL2* negative individuals have to be directed to sequencing. Real *KIR3DL2* negative will not amplify for the exons.

### *Ambiguities*

For some individuals ambiguous results may be obtained. The most frequent ambiguity in worldwide populations is *002/007* or *010/015*. Three PCR-SSP reactions have to be performed, detecting alleles *002*, *007* and *015*. Individuals carrying the genotype *002/007* should be positive for both *002* and *007* and negative for *015*. Contrary results have to be observed for individuals with genotype *010/015*.

Another frequent ambiguity, *001/007* or *006/010* can be solved combining PCR-SSP and sequence analyzes. Applying PCR-SSP (note 5), the allele *010* should be detected. To have more reliable results, the polymorphism C>T at position 15652 (intron 7) should be analyzed. Individuals heterozygous for this position have to be *0101/007*. Individuals homozygous C/C for that position may be *00103/007* or *006/010*. This combination of SSP and sequencing of intron 7 may be used for other ambiguities involving the allele *010*.

### Notes

1. Platinum Taq (Invitrogen) polymerase gives the most reliable and consistent results for this protocol.
2. Other protocols for PCR products purification may be used as well. A method which results in a very pure product is highly recommended.
3. This purification system may also be performed manually. See factory website instructions (<http://www.agencourt.com/technical>).
4. There are precipitation based protocols for sequencing products purification that might be used as well. A method which results in a very pure product is highly recommended.
5. The quality of DNA is the most important requirement for reliable PCR-SSP results. DNA extracted from heparinized blood should be avoided, as heparin is a PCR inhibitor (Satsangi et al., 1994).

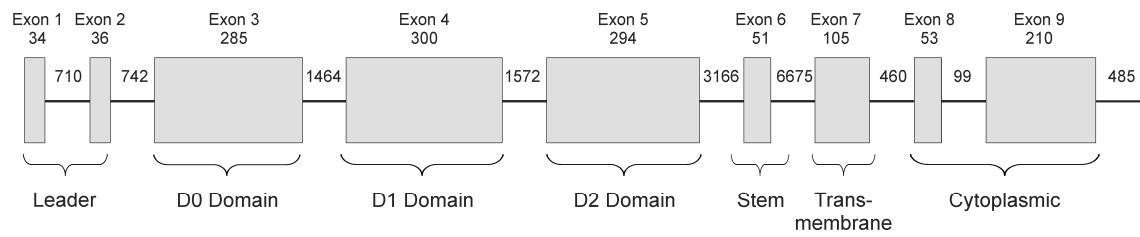
## References

- Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D and Jones AR Nucleic Acid Research 2011, 39, D913-D919
- Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, Weekes M, Willberg C, Aldemir H, Rowland-Jones S, Braud VM. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. Eur J Immunol. 2004 Jun;34(6):1673-9.
- Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. Immunol Rev. 2002
- Jamil KM, Khakoo SI. KIR/HLA interactions and pathogen immunity. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:29834
- Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. KIR genotyping by multiplex PCR-SSP. Methods Mol Biol. 2010;612:365-75
- Martin AM, Freitas EM, Witt CS, Christiansen FT. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. Immunogenetics 2000: 51: 268–80.
- Martin, M. P., and Carrington, M. (2008) KIR locus polymorphisms: genotyping and disease association analysis. Methods Mol Biol 415, 49–64.
- Robinson J, Mistry K, McWilliam H, Lopez R, Marsh SG. IPD – the Immuno Polymorphism Database. Nucleic Acids Res. 2010 Jan;38, D863-9.
- Satsangi, J., Jewell, D. P., Welsh, K., Bunce, M., and Bell, J. I. (1994) Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet 343, 1509–10
- Shilling, H. G., Young, N., Guethlein, L. A., Cheng, N. W., Gardiner, C. M., Tyan, D., et al. (2002) Genetic control of human NK cell repertoire. J Immunol 169, 239–47
- Sivori S, Falco M, Carlomagno S, Romeo E, Soldani C, Bensussan A, Viola A, Moretta L, Moretta A. A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. Blood. 2010 Sep 9;116(10):1637-47
- Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, Beck S, Trowsdale J. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 25;97(9):4778-83

**Table 1** Primers list for (A) sequencing and (B) resolving ambiguities.

Exon	Primer name	Direction	Sequence (5' to 3')	size (pb)
A				
Exon 3	3DL2ex3.5	Forward	ACA AAC CCT TCC TGT CTG CCC	276
	3DL2ex3.3	Reverse	CTG TGA CCA TGA TCA CCA	
Exon 4	3DL2ex4.5	Forward	TCC CTC CTG GCC CAC CCA GGG	283
	3DL2ex4.3-2	Reverse	CTG TGA TCA CGA TGT CCA GG	
Exon 5	3DL2ex5.5	Forward	GAC CTT GTC CTG TAG CTC CT	192
	3DL2_KIR20.3	Reverse	CAC ACG CAG GGC AGG G	
Exons 7-9	3DL2ex7.5	Forward	GTA TCT GCA GAC ACC TGC AT	983
	3DL2ex9.3-2	Reverse	CAG CTG CTG GTT CAT TGG AT	
B				
3DL2*002	3DL2 302-322F G	Forward	CTC CCT CAC TGG GTG GTC GG	1655
	3DL2 474-493R A	Reverse	AGG GGT CCT CAG AGA TCC CA	
3DL2*007	3DL2 302-322F A	Forward	CTC CCT CAC TGG GTG GTC GA	1655
	3DL2 474-493R C	Reverse	AGG GGT CCT CAG AGA TCC CC	
3DL2*010	3DL2 -8-12F T	Forward	GCA GCA CCA TGT CGC TCAC T	1778
	3DL2 322-337R C	Reverse	GGG GGT TGC TGG GTG C	
3DL2*015	3DL2 302-322F A	Forward	CTC CCT CAC TGG GTG GTC GA	1665
	3DL2 474-493R A	Reverse	AGG GGT CCT CAG AGA TCC CA	





**Figure 1** The exon-intron organization of the *KIR3DL2* gene. Numbers represent the length in base pairs (bp) of exons (boxes) and introns (dashes). The correlation between the exons and the domains of the mature protein are shown at the bottom. The figure is not to scale.

## ***KIR3DL2* alleles are associated to differential susceptibility to the autoimmune disease pemphigus foliaceus.**

Danillo G. Augusto<sup>1</sup>, Sara C. Lobo-Alves<sup>1</sup>, Marcia F. Melo<sup>2</sup>, Noemi F. Pereira<sup>2</sup>, Maureen P. Martin<sup>3</sup>, Mary Carrington<sup>3,4</sup> and Maria Luiza Petzl-Erler<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná

<sup>2</sup> Laboratório de Imunogenética, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná

<sup>3</sup> Cancer and Inflammation Program, Laboratory of Experimental Immunology, SAIC-Frederick, Inc., NCI-Frederick, Frederick, MD 21702, USA

<sup>4</sup> Ragon Institute of Massachusetts General Hospital, Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Boston, MA 02114, USA

**Running title:** *KIR3DL2* and the autoimmune disease pemphigus foliaceus

### **Corresponding author:**

Prof. Dr. Maria Luiza Petzl-Erler  
Departamento de Genética  
Universidade Federal do Paraná  
Caixa Postal 19071  
81531-990 Curitiba, Brazil  
Tel: (+5541) 33611746; 33611724  
Fax: (+5541) 33611793  
e-mail: danillo@ufpr.br; perler@ufpr.br

### **Abstract**

We have previously reported that activating *KIR* genes diminish the risk of developing pemphigus foliaceus (PF), an autoimmune disease of the skin, characterized by auto antibodies against desmoglein 1. Here, we analyzed if the allelic polymorphism of the inhibitory framework gene *KIR3DL2* influences the susceptibility to PF. We analyzed 156 patients and 143 control individuals living predominantly in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Eight new alleles were found. The frequency of individuals with the *KIR3DL2\*001* allele was increased in patients (OR = 1.9,  $p = 0.01$ ). The single nucleotide polymorphism allele *1190T* was associated with a lower risk for PF (OR = 0.53,  $p = 0.025$ ). The presence of at least one of the putative HLA ligands for *KIR3DL2* (*HLA-A\*03* or *HLA-A\*11*) did not differ significantly between patients and controls. We found positive association for the presence of both *KIR3DL2\*001* and at least one HLA-A ligand (OR = 2.89,  $p = 0.016$ ). We conclude that the *KIR3DL2* polymorphism may influence the susceptibility to pemphigus foliaceus. This is to our knowledge the first association study between an autoimmune disease and *KIR3DL2* alleles. High allelic diversity of *KIR3DL2* was observed in our population, in agreement with the history of the Brazilian population that was formed by European, African, Amerindian, eastern Asian and Middle Eastern admixture over the last few centuries. Allelic information is still lacking in most of the *KIR* studies and for the majority of the populations worldwide. Yet, this knowledge is crucial to comprehend the role that the variability of these genes plays in health and in disease.

**Key words:** killer cell immunoglobulin-like receptors, autoimmunity, pemphigus, fogo selvagem, genetic association, sequence-based typing

## Introduction

The *killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR)* genes are located at chromosome 19q3.14 in the Leukocyte Receptor Complex <sup>1,2</sup>. They are expressed on the surface of natural killer (NK) cells, regulating the balance of activating and inhibitory signals <sup>3</sup>. Present on virtually all haplotypes <sup>4,5</sup>, the framework *KIR3DL2* is the longest *KIR* gene and spans 16,256bp. It is also one of the most polymorphic *KIR*, with 84 described alleles <sup>6</sup>. The *KIR3DL2* receptor is a 70 kDa molecule with three extracellular domains and a long intracellular tail, carrying two tyrosine-based inhibitory motifs <sup>7</sup>. HLA-A3 and HLA-A11 appear to be the ligands of *KIR3DL2* <sup>8</sup>.

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune blistering disease of the skin characterized by autoantibodies against desmoglein 1, a molecule important for cell adhesion <sup>9</sup>. Endemic in Brazil, PF is strongly related to environmental factors (HANS-FILHO, G et al., 1996; AOKI et al., 2004). Many genes, including HLA class II, are associated to differential susceptibility of PF <sup>12-14</sup>. Recently, we reported that the presence of higher numbers and ratios of activating *KIR* genes and also HLA-Bw4 epitopes protect against PF (AUGUSTO et al., 2012A, submitted). The aim of this study was to verify if the allelic polymorphism of the inhibitory *KIR3DL2* and combinations of its alleles with HLA allotypes influence the susceptibility to PF.

## Material and Methods

We analyzed 156 patients and 143 controls without history of the disease, living predominantly in Mato Grosso do Sul State (MS), Brazil. The majority of the patients were contacted at the Hospital Adventista do Pênfigo in Campo Grande, MS, Brazil. All individuals voluntarily agreed to participate and written informed consent was obtained from all participants. This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Parana, in accordance with Brazilian Federal laws. The individuals were separated in two groups, according to their predominant ancestry: Euro-descendants (Euro) and Afro-descendants (Afro), because populations may differ in allele frequencies. Although this subdivision is subjective, this approach was validated by population genetic studies, which showed that the distribution of alleles known to be restricted to populations autochthonous from one continent follows a gradient among the population strata, as

expected if the classification discriminated the strata according to relative contributions of the ancestral populations<sup>15,16</sup>. When the frequencies between Euro-descendants and Afro-descendants did not differ statistically, they were analyzed as a single population sample, because the total sample may give us a better representation of the whole population. The individuals of predominantly Amerindian ancestry were excluded of the association analyzes, because of the small size of this population sample.

All individuals were genotyped for presence of *KIR3DL2* in a former study (AUGUSTO *et al.*, 2012A, submitted). Here, we sequenced the exons 3, 4, 5, 7, 8 and 9 and also intron 7 using gene specific primers and the PCR products were sequenced using the Big Dye terminator kit (Applied Biosystems). Specific PCR-SSP primers were designed to solve the frequent ambiguities 002/010 or 010/015, 001/007 or 006/010. Detailed protocol and primer sequences may be found in AUGUSTO *et al.*, 2012B (manuscript in preparation). The *HLA* genotyping was performed applying the LABType® SSO reagent kits (One Lambda, USA).

The *KIR3DL2* amplicons of all individuals were sequenced in both directions. For new alleles, products from at least two separate PCR reactions were sequenced. One new allele was considered confirmed when there were no heterozygous ambiguities. For those alleles seen in an unique individual, it was only considered confirmed if the individual was homozygous.

Population differentiation tests were performed by analyzes of 2x2 contingency tables, calculating the exact *P* value by the metropolis algorithm. The *P* value of 0.05 was adopted as the significance limit. The Mantel-Haenszel method<sup>17</sup> was applied for calculating the odds ratio (OR) and the 95% confidence intervals.

## Results

Allelic frequencies in patients and controls are shown in **Table 1** and **Supplementary figure 1**. The allele *KIR3DL2\*001* was associated to increased susceptibility to PF (OR = 1.9, *p* = 0.01; OR = 1.89, *p* = 0.003 for carrier and allele frequencies, respectively). We also analyzed if the frequency of SNPs 322A, 337G and 1190T (the first two located in exon 3 and the last one in exon 9) differed significantly between patients and controls. The allele 1190T was less frequent among the patients than among the controls in Euro-descendants (OR = 0.53, *p* = 0.025) (**Table 2**). We did not find any significant association for the other alleles.

The frequency of presence of at least one of the ligands (*HLA-A\*03* or *HLA-A\*11*) did not differ significantly between patients and controls. We found a positive association for the presence of both *KIR3DL2\*001* and at least one HLA-A ligand (OR = 2.89,  $p = 0.016$ ). We did not find any other association regarding combinations of the *HLA-A* ligands with other *KIR3DL2* alleles or SNPs (**Table 3**).

We have found eight new alleles (**Table 4**); three of them were seen in homozygous; the other five still have to be confirmed. Two individuals, previously shown to lack *KIR3DL2* (AUGUSTO *et al.*, 2012A in preparation) presented the hybrid *3DL1/v2* allele described in Africans by Norman *et al.* (2009). This variant is a recombinant hybrid gene, which telomeric portion is originally from *KIR3DL2* while the centromeric is from *KIR3DL1*.

## Discussion

The stronger association of the genotype *001/001* (OR = 3.86;  $P = 0.027$ ) when compared to the presence of *\*001* (OR = 2.1  $P = 0.02$ ) indicates an additive effect of this allele, the only one associated to PF. This is also corroborated by the lower and non significant OR found for the genotype *\*001/other* (presence of *\*001* and any other allele except *\*001*).

We also looked to all SNPs in the coding sequence to verify if they could influence the risk of PF. For these analyzes, the low heterozygosity SNPs (non informative) and those SNPs which frequency was explained mainly by a single allele were excluded. Therefore, only three SNPs were evaluated in this analysis: two in exon 3 and one in exon 9. The frequency of the allele *1190T* was decreased in Euro-descendant patients. This SNP, located in exon 9, causes an amino acid change (Thr375Met) in the cytoplasmic tail. Although no major changes of the structure of the mature protein are predicted for this replacement, the physicochemical properties of these two amino acids differ. While methionine is hydrophobic, threonine is neutral. In the Grantham scale <sup>18</sup>, which measures the physicochemical distance between all amino acid pairs, the value for threonine and methionine is 81. Low values indicate conservative and high values indicate radical replacements. Even though it is an intermediate value, the frequency of amino acid replacements that show such difference is relatively low in mammalian proteins. Zhang (2000) <sup>19</sup>, studying mammalian nuclear genes, estimated that only 17% of the transitions cause nonsynonymous substitutions that alter the polarity of the amino acids. Another and

more important characteristic that differs between these two amino acids is that only threonine may be phosphorylated by protein kinases in eukaryotic cells<sup>20</sup>. Although tyrosine phosphorylation has been known to be important for controlling both ITIM and ITAM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory and activating motifs, respectively) by recruiting the protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2<sup>21–23</sup>, the threonine phosphorylation is also reported as important for signal transduction in other molecules<sup>24,25</sup>. In addition, this amino acid replacement is adjacent to the tyrosine site located at the ITIM motif. Considering the importance of the phosphorylation regulating the KIR signaling and the proximity to the tyrosine site, this amino acid replacement may interfere in the receptor function.

We have recently reported that increased activating KIR function is protective against PF (AUGUSTO et al., 2012A submitted). Based on those results and bearing in mind the possible functional impact caused by the differences between threonine and methionine, we suggest that the polymorphism at the position 1190 may reduce the inhibitory function of the *KIR3DL2* receptor, protecting against the development of the disease. Therefore, \*001 lacking this SNP 1190T would be more effective on inhibition. In this cited former study, we also observed that the relative effect of *KIR* genes for the differential susceptibility of PF was stronger in Euro-descendants. The SNP 1190T being associated only in this stratum agrees with those results.

The presence of *HLA-A\*03* or *HLA-A\*11* was not significantly different between patients and controls and, isolated, the presence of these allotypes appear not to be important to PF pathogenesis. The recognition of these HLA ligands by *KIR3DL2* was described<sup>8</sup>, but this interaction remains not well established. According to these authors, *KIR3DL1\*001* recognizes HLA-A3 and HLA-A11 in a peptide-dependent manner, although direct evidence is still lacking. The presence of both *KIR3DL1\*001* and its putative ligands *HLA-A\*03* or *HLA-A\*11* was positively associated to PF (OR = 2.89, p = 0.016), and this association was stronger than the presence of *KIR3DL1\*001* alone (OR = 1.89, p = 0.003), which may suggest that the recognition of these molecules by *KIR3DL2* occurs indeed and that it may increase the risk to development of PF.

The study population is admixed among three major ethnic groups: Europeans, Africans and Amerindians. The African background of this population is corroborated by the presence of the chimeric *KIR3DL1/2v*, which is thought to be restricted to sub-Saharan

Africans and related populations such as African-Americans and Afro-Caribbeans<sup>26,27</sup>. As result of such admixture, we found elevated allelic diversity of *KIR3DL2* including eight new alleles. Some of them will be confirmed in further studies.

## Conclusion

We show that the polymorphism of *KIR3DL2* may influence the pemphigus foliaceus susceptibility. The allele *\*001* and also its putative ligands increase the risk of developing the disease. We suggested that the *SNP 1190T* may interfere in signal transduction, protecting against pemphigus foliaceus, a hypothesis to be tested.

## Acknowledgments

We thank all staff of Hospital Adventista do Penfigo for allowing us to work in this institution and all patients and controls who voluntarily agreed to participate of this work. This project was granted by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX, Fundação Araucária, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and federal funds from the National Cancer Institute, National Institutes of Health, under contract HHSN261200800001E. The content of this publication does not necessarily reflect the views or policies of the Department of Health and Human Services, nor does mention of trade names, commercial products, or organizations imply endorsement by the US Government. This Research was supported in part by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute, Center for Cancer Research.

## References

1. Wende, H., Colonna, M., Ziegler, A., Volz, A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **10**, 154-60 (1999).
2. Liu, W.R., Kim, J., Nwankwo, C., Ashworth, L.K., Arm, J.P. Genomic organization of the human leukocyte immunoglobulin-like receptors within the leukocyte receptor complex on chromosome 19q13.4. *Immunogenetics* **51**, 659-69 (2000).
3. Parham, P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunology letters* **92**, 11-3 (2004).
4. Martin, A.M., Freitas, E.M., Witt, C.S., Christiansen, F.T. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics* **51**, 268-80 (2000).
5. Hsu, K.C., Liu, X.-R., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R.J., Dupont, B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169**, 5118-29 (2002).
6. Robinson, J., Mistry, K., McWilliam, H., Lopez, R., Marsh, S.G.E. IPD--the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic acids research* **38**, D863-9 (2010).
7. Vilches, C., Parham, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology* **20**, 217-51 (2002).
8. Hansasuta, P., Dong, T., Thananchai, H., Weekes, M., Willberg, C., Aldemir, H., et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *European journal of immunology* **34**, 1673-9 (2004).
9. Chidgey, M. Desmosomes and disease: an update. *Histology and histopathology* **17**, 1179-92 (2002).
10. Hans-Filho, G., dos Santos, V., Katayama, J.H., Aoki, V., Rivitti, E.A., Sampaio, S.A., et al. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. *The Journal of investigative dermatology* **107**, 68-75 (1996).
11. Aoki, V., Millikan, R.C., Rivitti, E.A., Hans-Filho, G., Eaton, D.P., Warren, S.J.P., et al. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *The journal of investigative dermatology*. **9**, 34-40 (2004).
12. Petzl-Erler, M.L., Santamaria, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? *Tissue antigens* **33**, 408-14 (1989).
13. Pavoni, D.P., Roxo, V.M.M.S., Marquart Filho, A., Petzl-Erler, M.L. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. *Genes and immunity* **4**, 110-6 (2003).



14. Malheiros, D., Petzl-Erler, M.L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. *Genes and immunity* **10**, 547-58 (2009).
15. Braun-Prado, K., Vieira Mion, A.L., Farah Pereira, N., Culpi, L., Petzl-Erler, M.L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. *Tissue antigens* **56**, 417-27 (2000).
16. Probst, C.M., Bompeixe, E.P., Pereira, N.F., de O Dalalio, M.M., Visentainer, J.E., Tsuneto, L.T., et al. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Human biology* **72**, 597-617 (2000).
17. Mantel, N., Haenszel, W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *Journal of the National Cancer Institute* **22**, 719-48 (1959).
18. Grantham, R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science (New York, N.Y.)* **185**, 862-4 (1974).
19. Zhang, J. Rates of conservative and radical nonsynonymous nucleotide substitutions in mammalian nuclear genes. *Journal of molecular evolution* **50**, 56-68 (2000).
20. Bishop, A.C., Buzko, O., Shokat, K.M. Magic bullets for protein kinases. *Trends in cell biology* **11**, 167-72 (2001).
21. Colucci, F., Di Santo, J.P., Leibson, P.J. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nature immunology* **3**, 807-13 (2002).
22. Lanier, L.L. Natural killer cell receptor signaling. *Current opinion in immunology* **15**, 308-14 (2003).
23. Vivier, E., Nunès, J.A., Vély, F. Natural killer cell signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)* **306**, 1517-9 (2004).
24. McCubrey, J.A., May, W.S., Duronio, V., Mufson, A. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **14**, 9-21 (2000).
25. Liu, J., Puscheck, E.E., Wang, F., Trostinskaia, A., Barisic, D., Maniere, G., et al. Serine-threonine kinases and transcription factors active in signal transduction are detected at high levels of phosphorylation during mitosis in preimplantation embryos and trophoblast stem cells. *Reproduction (Cambridge, England)* **128**, 643-54 (2004).
26. Norman, P.J., Abi-Rached, L., Gendzekhadze, K., Korbel, D., Gleimer, M., Rowley, D., et al. Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. *Nature genetics* **39**, 1092-9 (2007).
27. Norman, P.J., Abi-Rached, L., Gendzekhadze, K., Hammond, J.A., Moesta, A.K., Sharma, D., et al. Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes, alleles, and haplotypes. *Genome research* **19**, 757-69 (2009).

**Table 1** Allelic frequencies of *KIR3DL2* in the pemphigus foliaceus patients and the controls. The frequencies in another Brazilian population are informed for comparisons.

Alleles	Patients		Controls	
	%	<i>fA</i>	%	<i>fA</i>
<i>3DL2*001</i>	40.4	0.242	26.2	0.144
<i>3DL2*002</i>	45.5	0.248	37.6	0.224
<i>3DL2*003</i>	9.6	0.048	14.2	0.083
<i>3DL2*005</i>	11.3	0.058	10.6	0.061
<i>3DL2*006</i>	9.0	0.045	8.5	0.043
<i>3DL2*007</i>	30.1	0.168	33.3	0.195
<i>3DL2*008</i>	0.0	0.000	0.0	0.000
<i>3DL2*009</i>	8.3	0.042	12.8	0.069
<i>3DL2*010</i>	11.5	0.061	16.3	0.083
<i>3DL2*011</i>	2.6	0.010	5.7	0.029
<i>3DL2*015</i>	0.6	0.003	0.7	0.004
<i>3DL2*019</i>	0.6	0.003	2.8	0.014
<i>3DL2*020</i>	0.6	0.003	0.0	0.000
<i>3DL2*023</i>	0.6	0.003	0.0	0.000
<i>3DL2*026</i>	0.6	0.003	0.0	0.000
<i>3DL2*028</i>	0.0	0.000	0.7	0.004
<i>3DL2*029</i>	1.3	0.006	0.0	0.000
<i>3DL2*038</i>	4.5	0.026	5.0	0.025
<i>3DL2*043</i>	0.0	0.000	0.7	0.004
<i>3DL2*058</i>	0.6	0.003	0.0	0.000
<i>3DL2*062</i>	0.6	0.003	0.0	0.000
New		0.023		0.018

% carrier frequency, *fA* allele frequency. Total sample is shown.

\*Available on Allele frequencies.net (Gonzalez-Galarza et al., 2011). This Brazilian population was included for comparisons.

**Table 2** *KIR3DL2\*001* and the SNP *1190T* allele are associated to pemphigus foliaceus

		Patients		Controls				
		n	F (%)	n	F(%)	P	OR	95% CI
Allele frequencies								
001	Euro	46	22.3	22	12.4	0.011	2.04	1.17 - 3.54
	Afro	29	27.9	18	18.2	0.102	1.74	0.89 - 3.39
	Total	75	24.2	40	14.4	0.003	1.89	1.24 - 2.89
Carrier frequencies								
001	Euro	39	37.5	20	22.2	0.021	2.1	1.11 - 3.97
	Afro	24	46.2	17	33.3	0.183	1.71	0.77 - 3.81
	Total	63	40.4	37	26.2	0.010	1.9	1.16 - 3.11
Genotypes								
001+001	Total	12	7.7	3	2.1	0.027	3.86	1.06 - 13.97
001+other	total	51	36.7	34	23.8	0.087	1.55	0.93 - 2.60
SNPs								
322A	Euro	40	38.5	48	51.1	0.074	0.6	0.34 - 1.05
	Afro	27	51.9	24	47.1	0.308	0.70	0.35 - 1.38
	Total	67	42.9	72	49.7	0.243	0.76	0.48 - 1.20
337G	Euro	29	27.9	25	26.6	0.840	1.07	0.57 - 2.00
	Afro	9	17.3	15	29.4	0.146	0.50	0.20 - 1.28
	Total	38	24.4	40	27.6	0.522	0.85	0.50 - 1.42
1190T	Euro	40	38.5	51	54.3	0.025	0.53	0.29 - 0.93
	Afro	23	44.2	21	41.2	0.752	1.13	0.52 - 2.47
	Total	63	40.4	72	49.7	0.106	0.69	0.43 - 1.08

n = number of individuals; F = frequency; In bold, the significant values.

**Table 3** Association analysis between pemphigus foliaceus and *KIR3DL2* alleles and the putative HLA-A ligands of KIR3DL2.

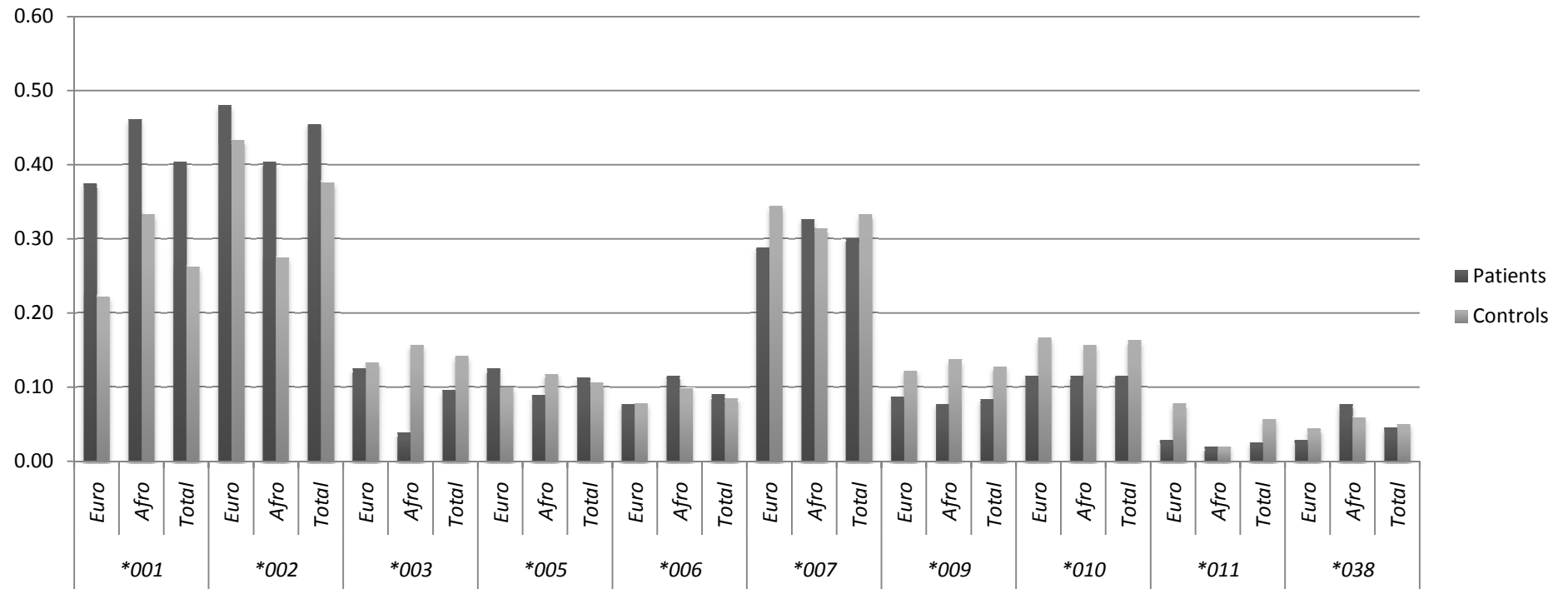
	Patients		Controls		P	OR	(95%) CI
	n	F (%)	n	F(%)			
Carrier frequencies							
<b>HLA-A ligand</b>	70	44.3	36	35.0	0.210	1.39	0.83 - 2.31
<b>001 + HLA-A ligand</b>	24	21.1	7	8.4	<b>0.016</b>	<b>2.89</b>	<b>1.18 - 7.09</b>
<b>322A + HLA-A ligand</b>	16	14.0	9	10.7	0.488	1.36	0.57 - 3.25
<b>337G + HLA-A ligand</b>	13	10.5	9	10.7	1.000	0.97	0.40 - 2.40
<b>1190T + HLA-A ligand</b>	15	13.2	11	13.1	1.000	1.01	0.44 - 2.32

Total sample is shown. Ligand means the presence of at least one *HLA-A\*03* or *HLA-A\*11*

**Table 4** The nine new *KIR3DL2* alleles found in this study

	Exon 3			Exon 4			Exon 5		Exon 9			Intron 7		
	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	
ID	<b>122</b>	<b>322</b>	<b>337</b>	<b>394</b>	<b>456</b>	<b>470</b>	<b>773</b>	<b>785</b>	<b>1190</b>	<b>1244</b>	<b>1324</b>	<b>15385</b>	<b>15652</b>	
<i>N1</i>		A						G	T				C	Confirmed (1)
<i>N2</i>		A					G		T				C	Confirmed (2)
<i>N3</i>	A			A						G			C	Confirmed (1)
<i>N4</i>	A	A							T			C	C	Unconfirmed
<i>N5</i>											G		C	Unconfirmed
<i>N6</i>	A				T								C	Unconfirmed
<i>N7</i>	A			A					T				C	Unconfirmed
<i>N8</i>						A							NT	Unconfirmed

ID = identification of the new allele; NT=not tested; in bold, the consensus nucleotide and its position within each exon or intron. Number in parenthesis reveals the number of individuals carrying the confirmed new allele.

**Supplementary figure 1** Carrier frequencies of *KIR3DL2* alleles.

Only the alleles with frequency higher than 0.01 in both patients and controls are shown.

## Characterization of the highly polymorphic *KIR3DL2* in Amerindian and urban Brazilian populations: ten new alleles were found.

Danillo G. Augusto<sup>1</sup>, Marcia R. Pincerati<sup>2</sup>, Maureen P. Martin<sup>3</sup>, Mary Carrington<sup>3,4</sup> and Maria Luiza Petzl-Erler<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná

<sup>2</sup>Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, São Paulo 05508-090, Brazil

<sup>3</sup>Cancer and Inflammation Program, Laboratory of Experimental Immunology, SAIC-Frederick, Inc., NCI-Frederick, Frederick, MD 21702, USA

<sup>4</sup>Ragon Institute of Massachusetts General Hospital, Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Boston, MA 02114, USA

**Running title:** *KIR3DL2* allelic diversity in Brazilian populations

**Corresponding author:**

Prof. Dr. Maria Luiza Petzl-Erler  
Departamento de Genética  
Universidade Federal do Paraná  
Caixa Postal 19071  
81531-990 Curitiba, Brazil  
Tel: (+5541) 33611746; 3611724  
Fax: (+5541) 33611793  
e-mail: danillo@ufpr.br; perler@ufpr.br

### Abstract

High allelic diversity has been reported for *KIR3DL2* gene. However, few populations have been studied so far. Here, we describe nine Brazilian populations, including urban, Asian, African and Amerindian. We applied a high resolution sequencing based typing (SBT) method and performed comparisons with other described populations. A total of 34 alleles were detected in this study, ten of which have never been described before. Low allelic diversity was found in Amerindians when compared to urban populations, as expected considering the founder effect that the Amerindians may have had suffered during the migration to America. The allele *KIR3DL2\*038*, recently described and frequent in the present populations, may have been misinterpreted as *KIR3DL2\*008*, which is reported in high frequency in Asians. The non-detected absence of *KIR3DL2* in heterozygous, may cause a bias on Hardy Weinberg equilibrium and it has to be considered in population studies. This work highlights the importance of the high resolution approach to study *KIR3DL2* alleles and contributes with the actual knowledge about the diversity of this gene.

**Key words:** KIR, 3DL2, SBT, sequencing, alleles, population, Amerindians

## Introduction

NK cells are responsible for lysis of infected or altered cells <sup>1</sup> and also participate of the adaptive immune response <sup>2</sup>. The NK recognition occurs due the joint recognition and signaling of several receptors, including the killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR). *KIR* genes are expressed on the surface of natural killer (NK) cells and recognize HLA molecules. They are subdivided in activating or inhibitory receptors and the balance of these signals in the NK recognition context modulate the NK response <sup>3</sup>.

One of the most remarkable features about *KIR* genes is the high polymorphism of this complex, in both presence/absence and allele polymorphism. *KIR3DL2* is the longest *KIR* gene and also is one of the most polymorphic of the *KIR* family, with more than 80 described alleles registred in the Immuno Polymorphism Database – IPD <sup>4</sup>. The *KIR3DL2* gene organization is shown in **Figure 1**. *KIR3DL2* is a framework gene located at the most telomeric region <sup>5,6</sup>. Although it was considered to be present in all haplotypes, individuals lacking *KIR3DL2* have been reported in Brazilian Amerindians <sup>7</sup>, Northern Brazil (unpublished results of Dr. Eduardo J.M. Santos), Asians <sup>8,9</sup> and the highest frequency of *KIR3DL2* absence (4.3%) was reported in Europeans from Azores <sup>10</sup>. *KIR3DL2* is thought to recognize HLA-A3 and HLA-A11 <sup>11</sup>, but direct evidence is still lacking. *KIR3DL2* also binds microbial CpG oligodeoxynucleotides at the cell surface, than delivery them to the early endosomes where they can bind to toll like receptor 9 (TLR9). This recognizing seems to occur by DO domain (exon 3) of all KIR and it was recently reported as a novel role that these receptors can play regarding the antimicrobial response <sup>12</sup>.

Few population studies were performed regarding *KIR3DL2* allelic diversity. There are only fifteen populations listed on Allele frequencies.net <sup>13</sup>, being only one Brazilian, from Belo Horizonte, the capital city of Minas Gerais (MG) State. There are no reports for Amerindian populations. The aim of this work was to characterize the *KIR3DL2* allele diversity in nine Brazilian populations (two urban, five Amerindian, one Asian and also one African sample that live in Brazil).



## Material and Methods

*Population samples* In total, 763 individuals were genotyped. We analyzed five Brazilian Amerindian populations: Guaraní Nāndeva (GND, n=76), from Amambaí (23°06'S; 55°12'W) and Porto Lindo (23°48'S; 54°30'W), in Mato Grosso do Sul State. Guaraní Kaiowá (GKW, n=144) from Amambaí e also from Limão Verde (23°12'S; 55°06'W), Mato Grosso do Sul State; Kaingang (KRC, n=88) from Rio das Cobras (25°18'S, 52°32'W), Paraná State; Kaingang (KIV, n=69) from Ivaí (24°30'S, 51°40'W), Paraná State and Guaraní M'Byá (GRC, n=63) also from Rio das Cobras, Paraná State. Amerindian samples collection and DNA extraction were previously described<sup>14–16</sup>. For the Urban populations, we studied one urban population from Curitiba (25°25'S, 49°16'W, n=125), capital city of Paraná State and surrounding area. This population is of predominantly European ancestry and its *KIR* presence/absence polymorphism was already published<sup>17</sup>. We also analyze The Campo Grande sample, which is composed by individuals living in all Mato Grosso do Sul State, but mainly in the capital city, Campo Grande (20°26'S, 54°38'W, n = 141). This population was already studied for *KIR3DL2* alleles as controls of an association study (Augusto et al., 2012, submitted). The Brazilian Asian population (Ori-BR, n=46), which also live in Curitiba, is composed by individuals who had all their ascendants born in Japan, with no related miscegenation. A small sample of Africans (n=11) who migrated to Brazil and live in Curitiba, was also analyzed. The DNA extraction of these urban populations was carried out by our laboratory team during the last few years. Consent information was obtained for all individuals analyzed.

*KIR3DL2 genotyping* was performed by sequencing, as described by Augusto et al. (2012, in preparation).

*Statistical analyzes* Cavalli-Sforza's genetic distances<sup>18</sup> was estimated and used to construct a dendrogram by the Neighbor-joining method<sup>19</sup>. Both analyses were made with the software package Phylip<sup>20</sup> and the dendrogram was drawn using TreeView software<sup>21</sup>. Principal component analyzes were done in Minitab® statistics software. We performed the expectation–maximization (EM) algorithm<sup>22</sup> applying the Genepop software<sup>23</sup>.

## Results

In the present study we found 34 alleles (**Table 1**). The frequent allele in worldwide populations, *KIR3DL2\*001* was found in low frequency in Amerindians, being absent in KIV. The alleles *KIR3DL2\*002*, *KIR3DL2\*007* and *KIR3DL2\*010* were the most frequent in Amerindians, and together, they summed frequencies between 0.75 (GRC) to 0.94 (KIV). For ORI-Br, these three alleles together also reached 0.77, being the most important alleles representing the *KIR3DL2* diversity of these populations. On the other hand, 17 and 20 alleles were found in the urban Curitiba and Campo Grande, which nine alleles with frequencies higher than 0.05. Ten new alleles were described for the first time in our study (**Table 2**). We found three new single nucleotide positions in exon 3 (alleles *N5*, *N6* and *N9*), one in exon 5 (*N2*) and one in exon 9 (*N4*).

To perform a test of population differentiation, we included other described populations. The result showed that most of populations differed statistically (**Table 3**). Orientals, Amerindians and urban populations were grouped in three major clades in the neighbor-joining dendrogram (**Figure 2**). Similar grouping was seen in the principal component analyzes (**Figure3**).

From all the populations studied, we found five populations in HW disequilibrium: GRC ( $p=0.002$ ), KIV ( $p=0.02$ ), Ori-BR ( $p=0.001$ ) and, KRC ( $p=0.001$ ) Campo Grande ( $p<10^{-3}$ ). All populations showed excess of homozygotes, except in KIV, which showed significant excess of the heterozygous 002/007 ( $p=0.01$ ) and 002/010 ( $p=0.01$ ). Considering the fact that absent *KIR3DL2* individuals have been described<sup>7-10</sup>, we wondered if the significant excess of homozygous could be consequence of the non detection of the *KIR3DL2* absence by sequencing. In this case, the heterozygous *KIR3DL2*+/*KIR3DL2*- would be interpreted as homozygous *KIR3DL2*+/*KIR3DL2*+. We performed the expectation–maximization (EM) algorithm<sup>22</sup> to estimate the frequencies of the absence of *KIR3DL2* in all populations, even for that which were not found in HW disequilibrium. According to this method, the estimated allele frequencies, including the absence of *KIR3DL2*, are seen in **Table 4**. Due the similarity of the frequencies according these two approaches, no differences for the population comparisons performed were seen (data not shown).

## Discussion

This is the first study describing *KIR3DL2* alleles in Amerindian populations. Besides, we also studied other urban Brazilians populations. Recently, *KIR3DL2* has demonstrated to be highly polymorphic. High diversity and several new alleles were found in the present study, showing that there are much what to know about *KIR3DL2* polymorphism yet. As expected, a small number of alleles was found in Amerindians (6 to 10 alleles) and only three alleles comprised between 75% to 94% of the allelic diversity in Amerindians. These three alleles, *KIR3DL2\*002*, *KIR3DL2\*007* and *KIR3DL2\*010*, are also found in high frequency in Ori-Br and other Asians<sup>8,9</sup>. This result is compatible with the founder effect that Amerindians may have had suffered when they migrated to America<sup>24</sup>. According to this model, it's more likely that the lowest frequent alleles would disappear by demographic factors, like genetic drift, and the most frequent alleles would remain in high frequencies<sup>25</sup>. On the other hand, we found high diversity in urban populations, being 17 and 20 alleles found in the urban Curitiba and Campo Grande respectively. Even with just eleven individuals, three new alleles were found only in Africans.

We found five new SNPs within the most polymorphic exons (3, 4 and 5), which codify the extracellular domains. Only one new SNP was found in another region, exon 9, which codify the intracellular tail. Polymorphism in these two regions may influence the *KIR* recognition and inhibitory signal transduction respectively. Understanding the *KIR* allelic diversity may help us to comprehend the function of these receptors and the functional impact that they may cause in diseases.

The allele frequencies were consistent with other population studies. The most divergent alleles were *KIR3DL2\*008* and *KIR3DL2\*038*. The first one was absent in all of our populations, but present in high frequency, especially in Asians. The *KIR3DL2\*038* allele was not found in our populations, even in Ori-BR population, characterized individuals of exclusively Japanese background. Interestingly, its frequency in ORI-Br was similar to the frequency of *3DL2\*008* in Japanese. Considering the coding sequence, *KIR3DL2\*008* has similarity to the recently reported, and still unconfirmed, *3DL2\*038*. However, there are many intronic SNPs differing these two alleles, including in exon 7, which we have sequenced and carefully analyzed. In addition, the Japanese, Irish and Chinese populations compared in this study were

genotyped by PCR-SSP or PCR-SSOP<sup>13</sup>. Considering the fact of *3DL2\*038* is a relatively new allele and also that those studies were performed with low resolution methods, we believe that *3DL2\*038* may have been currently misinterpreted as *3DL2\*008* in those populations. *3DL2\*008* was reported in Euro and Afro descendant from USA by a SBT method<sup>26,27</sup>, but in low frequency. On the other hand, *3DL2\*038* was not found in those studies.

All the comparisons among populations (**Table 3**, **Figure 1** and **Figure 2**) were consistent with geography and ancestry. For these analyzes, we considered *3DL2\*008* and *3DL2\*038* as the same allele. Three groups were seen in dendrogram (**Figure 1**) and similar results were found for the PCA analyzes (**Figure 2**). It is important to remember that grouping of populations may result from common ancestry, gene flow, natural selection and also other demographic factors, which means that the internal nodes of the dendrogram do not represent a common ancestral population. These results revealed that common ancestry is the major factor resulting in similarity of KIR gene frequencies.

The Hardy-Weinberg disequilibrium was seen in five populations. One of the reasons to this result could be genotyping error. However, the frequencies of our urban populations were similar to those reported for populations of similar ancestry<sup>8,9,26,28</sup>. Another point is the nature of the polymorphism of *KIR* genes and the methods to determine the allele frequencies by sequencing. Though *KIR3DL2* has been reported as a framework gene, there are evidences that absent *KIR3DL2* haplotypes are high frequent in some populations (Azores<sup>10</sup>, some Asians<sup>8,9</sup> and one Brazilian Amerindian<sup>7</sup>). We suspected that haplotypes lacking *KIR3DL2* could be the reason for this bias, once we cannot identify them by sequencing. The presence of these haplotypes could cause a misinterpretation during the genotyping, being the heterozygous *KIR3DL2*/absence considered homozygous. We performed an expectation-maximization algorithm<sup>22</sup> to estimate how frequent this null allele (*KIR3DL2* absence) could be. This model assumes that the bias causing HW disequilibrium is due the non-detected allele. All the estimated frequencies are shown in **Table 4**. Minor differences are observed for the detected alleles. Interestingly, the populations which we estimated the highest frequencies for *KIR3DL2* absence in our study (Ori-BR, 0.05 and Amerindians, from 0.015 to 0.05) have the same ancestry that those populations which

the *KIR3DL2* absence was previously reported in high frequency. It could explain why we found HW disequilibrium in the present populations. Considering that those haplotypes are rare in the majority of described populations, the presence in considerable high frequency in our populations could be result of demographic factors, such random drift and/or founding effect. The presence of this undetected variant within worldwide populations could result in super estimating the frequencies of some frequent alleles and increasing the number of homozygous, interfering some population comparisons. Studying worldwide populations, in this particular case, specially isolated and other Amerindian populations, could help to understand the distribution of these haplotypes and their functional impact for *KIR* response.

## Conclusion

*KIR3DL2* has been shown as one of the most polymorphic *KIR* genes. Nevertheless, only few populations were studied for its allele diversity and there is little information about the impact of the allele diversity in the receptor function. Our study showed that analyses of new populations for the *KIR3DL2* gene can be important to reveal new alleles and to shed light in the real diversity of this locus. It also reinforces the need of investigation of more populations. Still, our study showed that *KIR3DL2* absence could be more pronounced than previously found, and thus, it should be considered in worldwide population studies.

## References

1. Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology* **17**, 189-220 (1999).
2. Marcenaro, E., Carlomagno, S., Pesce, S., Moretta, A., Sivori, S. Bridging Innate NK Cell Functions with Adaptive Immunity. *Advances in experimental medicine and biology* **780**, 45-55 (2012).
3. Parham, P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunology letters* **92**, 11-3 (2004).
4. Robinson, J., Mistry, K., McWilliam, H., Lopez, R., Marsh, S.G.E. IPD--the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic acids research* **38**, D863-9 (2010).
5. Uhrberg, M., Parham, P., Wernet, P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* **54**, 221-9 (2002).
6. Hsu, K.C., Liu, X.-R., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R.J., Dupont, B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169**, 5118-29 (2002).
7. Ewerton, P.D., Leite, M. de M., Magalhães, M., Sena, L., Melo dos Santos, E.J. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. *Immunogenetics* **59**, 625-30 (2007).
8. Mogami, S., Hasegawa, G., Nakayama, I., Asano, M., Hosoda, H., Kadono, M., et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes in Japanese patients with type 1 diabetes. *Tissue antigens* **70**, 506-10 (2007).
9. Miyashita, R., Tsuchiya, N., Yabe, T., Kobayashi, S., Hashimoto, H., Ozaki, S., et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with microscopic polyangiitis. *Arthritis and rheumatism* **54**, 992-7 (2006).
10. Fialho, R.N., Martins, L., Pinheiro, J.P., Bettencourt, B.F., Couto, A.R., Santos, M.R., et al. Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors, and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis. *Human immunology* **70**, 915-20 (2009).
11. Hansasuta, P., Dong, T., Thananchai, H., Weekes, M., Willberg, C., Aldemir, H., et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *European journal of immunology* **34**, 1673-9 (2004).

12. Sivori, S., Falco, M., Moretta, L., Moretta, A. Extending killer Ig-like receptor function: from HLA class I recognition to sensors of microbial products. *Trends in immunology* **31**, 289-94 (2010).
13. Gonzalez-Galarza, F.F., Christmas, S., Middleton, D., Jones, A.R. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic acids research* **39**, D913-9 (2011).
14. Tsuneto, L.T., Probst, C.M., Hutz, M.H., Salzano, F.M., Rodriguez-Delfin, L.A., Zago, M.A., et al. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. *Tissue antigens* **62**, 512-26 (2003).
15. Petzl-Erler, M.L., Luz, R., Sotomaior, V.S. The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indian tribes: the Kaingang and the Guarani. *Tissue antigens* **41**, 227-37 (1993).
16. Petzl-Erler, M.L., McDevitt, H.O. Molecular analysis of the HLA-DRB genes in two tribes of Brazilian Indians. *Human immunology* **41**, 180-4 (1994).
17. Augusto, D.G., Zehnder-Alves, L., Pincerati, M.R., Martin, M.P., Carrington, M., Petzl-Erler, M.L. Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population. *Immunogenetics* **64**, 143-152 (2012).
18. Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American journal of human genetics* **19**, 233-57 (1967).
19. Saitou, N., Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **4**, 406-25 (1987).
20. Felsenstein, J. Inferring phylogenies from protein sequences by parsimony, distance, and likelihood methods. *Methods in enzymology* **266**, 418-27 (1996).
21. Page, R.D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* **12**, 357-8 (1996).
22. Dempster, D.P., Laird, N.M., Rubin, D.B. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society* **39**, 1-38 (1977).
23. Raymond, M., Rousset, F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249 (1995).
24. Wang, S., Lewis, C.M., Jakobsson, M., Ramachandran, S., Ray, N., Bedoya, G., et al. Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS genetics* **3**, e185 (2007).

25. Bamshad, M., Wooding, S.P. Signatures of natural selection in the human genome. *Nature reviews. Genetics* **4**, 99-111 (2003).
26. Gedil, M.A., Steiner, N.K., Hurley, C.K. KIR3DL2: diversity in a hematopoietic stem cell transplant population. *Tissue antigens* **70**, 228-32 (2007).
27. Hou, L., Jiang, B., Chen, M., Ng, J., Hurley, C.K. The characteristics of allelic polymorphism in killer-immunoglobulin-like receptor framework genes in African Americans. *Immunogenetics* **63**, 549-59 (2011).
28. Middleton, D., Meenagh, A., Moscoso, J., Arnaiz-Villena, A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue antigens* **71**, 105-13 (2008).



n=	GKW 144		GND 76		GRC 63		KRC 88		KIV 69		Curitiba 125		ORI-Br 46		C.Grande 141		African 11	Ireland*	Japan*	China*
Allele	%	fG	%	fG	%	fG	%	fG	%	fG	%	fG	%	fG	%	fG	fG	fG	fG	fG
001	10.4	0.052	17.1	0.092	25.4	0.151	1.1	0.006	0.0	0.000	32.0	0.170	6.5	0.043	26.2	0.144	0.409	0.280	0.080	0.040
00101	8.3	0.042	15.8	0.086	14.3	0.071	0.0	0.000	0.0	0.000	19.2	0.105	6.5	0.043	12.1	0.065	0.091	ND	ND	ND
00103	2.1	0.010	1.3	0.007	11.1	0.079	1.1	0.006	0.0	0.000	12.8	0.065	0.0	0.000	12.1	0.061	0.318	ND	ND	ND
002	78.5	0.552	63.2	0.454	41.3	0.238	58.0	0.381	62.3	0.355	36.8	0.223	76.1	0.511	38.3	0.227	0.182	0.200	0.460	0.560
00301	0.7	0.003	1.3	0.007	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	25.6	0.126	0.0	0.000	14.2	0.083	0.045	0.070	0.000	0.000
00302	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.8	0.004	0.0	0.000	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
00501	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	15.2	0.081	2.2	0.011	10.6	0.061	0.000	0.080	0.000	0.000
006	2.1	0.010	1.3	0.007	19.0	0.095	13.6	0.068	5.8	0.036	3.2	0.016	2.2	0.011	8.5	0.043	0.045	0.010	0.000	0.010
00701	56.9	0.344	46.1	0.309	57.1	0.389	69.3	0.460	65.2	0.428	33.6	0.194	23.9	0.120	33.3	0.194	0.000	0.180	0.120	0.130
008	2.1	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.000	0.040	0.110	0.090
009	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	1.4	0.007	10.4	0.057	2.2	0.022	12.8	0.068	0.136	0.080	0.070	0.030
010	0.0	0.010	19.7	0.099	23.8	0.127	13.6	0.074	30.4	0.159	10.4	0.053	28.3	0.141	16.3	0.083	0.000	0.030	0.120	0.140
01101	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	4.8	0.024	0.0	0.000	5.7	0.029	0.000	0.060	0.000	0.000
012	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
014	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000
015	4.9	0.028	3.9	0.020	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	1.6	0.008	6.5	0.033	0.7	0.004	0.000	0.000	0.030	0.010
016	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000
019	0.0	0.000	1.3	0.007	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	2.8	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000
023	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.8	0.004	0.0	0.000	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
026	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
028	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.7	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000
038	0.0	0.000	1.3	0.007	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	4.0	0.020	21.7	0.109	5.0	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000
043	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.7	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000
055	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	2.9	0.014	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
new	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000	2.3	0.011	0.0	0.000	4.8	0.024	0.0	0.000	3.5	0.018	0.136	0.000	0.000	0.000

\*Available on Allele frequencies.net

**Table 1 KIR3DL2 allele frequencies among populations.** fG = gene frequency; ND = Not determined;

Population	ID	Exon 3						Exon 4		Exon 5			Exon 9		Intron 7	Status (number of carriers)
		G 122	G 158	T 181	G 318	G 322	C 337	C 394	G 497	A 773	G 813	G 893	C 1190	T 1324	T 15652	
A	N1						G	A							C	Confirmed by cloning (1)
a, b	N2					A				G			T		C	Confirmed by sequencing (2)
a, c, d	N3	A						A					T		C	Confirmed by sequencing (3)
b	N4	A						A						G	C	Confirmed by sequencing (1)
a	N5				T		G		A						C	Unconfirmed (1)
a	N6		A													Unconfirmed (1)
a	N7					A		A							C	Unconfirmed (1)
c	N8											A			C	Unconfirmed (1)
d	N9			C			G								C	Unconfirmed (1)
d	N10						G			A					C	Unconfirmed (1)

a = Curitiba, b = Campo Grande, c = KRC, d = African

**Table 2 Ten new alleles found in the present study**

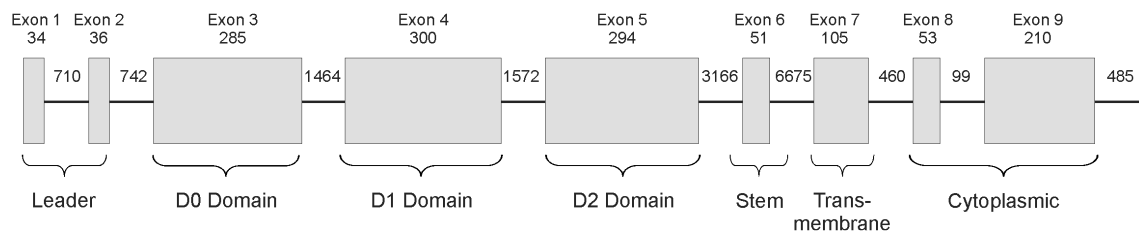
	GKW	GND	GRC	KRC	KIV	Curitiba	ORI-Br	C.Grande	Japan	China
GKW										
GND	+									
GRC	+	+								
KRC	+	+	+							
KIV	+	+	+	-						
Curitiba	+	+	+	+	+					
ORI-Br	+	-	+	+	+	+				
C.Grande	+	+	+	+	+	-	+			
Japan	+	+	+	+	+	+	-	+		
China	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
Ireland	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

**Table 3 Differences among populations.** Plus=significant difference; minus=non-significant difference ( $p < 0.05$ ). Frequencies for Japan, China and Ireland are found in Allele frequencies.net<sup>13</sup>

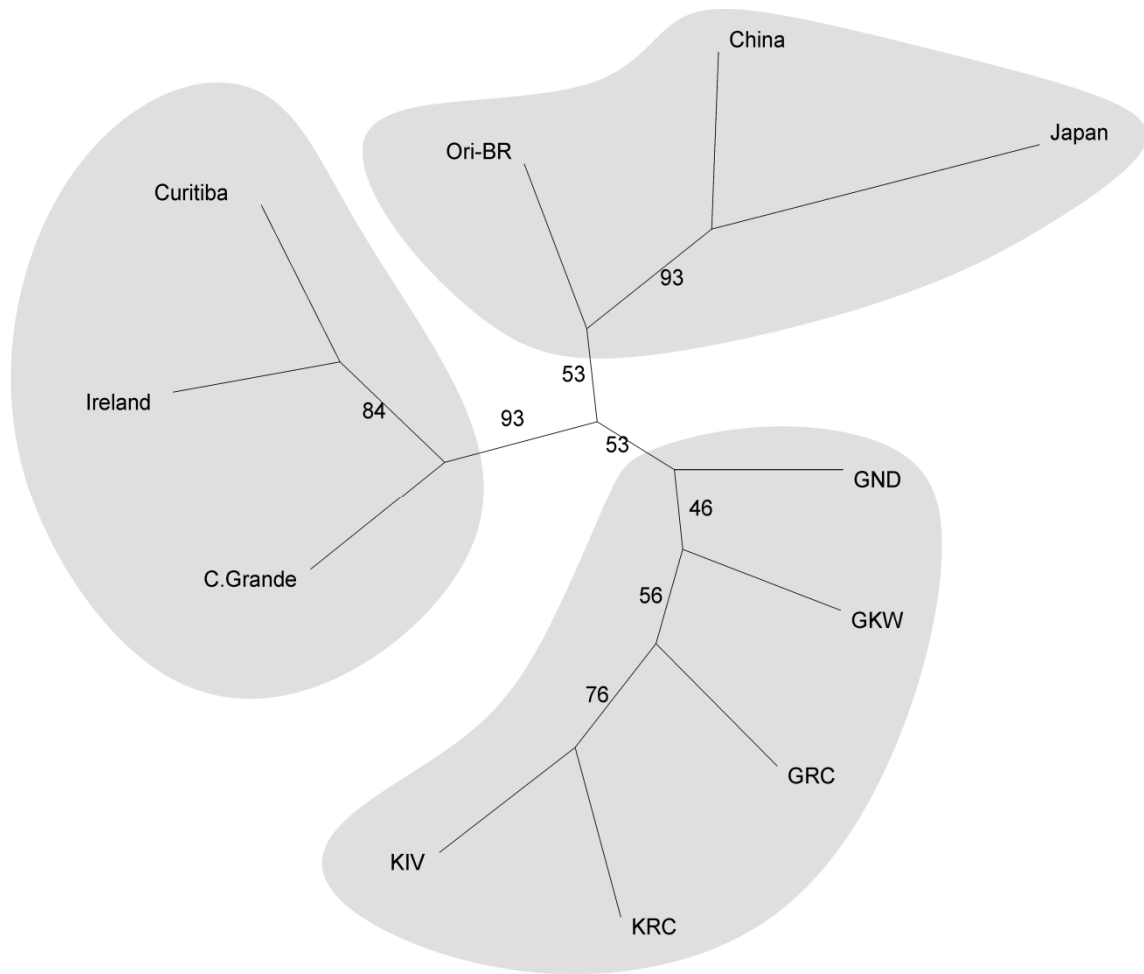
	<b>GKW</b>		<b>GND</b>		<b>GRC</b>		<b>KRC</b>		<b>KIV</b>		<b>Curitiba</b>		<b>ORI-Br</b>		<b>C.Grande</b>	
n=	<b>144</b>		<b>76</b>		<b>63</b>		<b>88</b>		<b>69</b>		<b>125</b>		<b>46</b>		<b>141</b>	
Allele	a	b	A	b	a	b	a	b	a	b	A	b	a	b	a	b
<b>001</b>	<b>0.052</b>	<b>0.052</b>	<b>0.089</b>	<b>0.092</b>	<b>0.138</b>	<b>0.151</b>	<b>0.006</b>	<b>0.006</b>	0.000	0.000	<b>0.161</b>	<b>0.170</b>	<b>0.035</b>	<b>0.043</b>	<b>0.144</b>	<b>0.144</b>
<b>002</b>	<b>0.544</b>	<b>0.042</b>	<b>0.428</b>	<b>0.086</b>	<b>0.229</b>	<b>0.071</b>	<b>0.366</b>	<b>0.381</b>	<b>0.350</b>	<b>0.355</b>	<b>0.221</b>	<b>0.105</b>	<b>0.489</b>	<b>0.043</b>	<b>0.225</b>	<b>0.227</b>
<b>00301</b>	<b>0.004</b>	<b>0.003</b>	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.126</b>	<b>0.126</b>	0.000	0.000	<b>0.077</b>	<b>0.083</b>
<b>00501</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.081</b>	<b>0.081</b>	<b>0.011</b>	<b>0.011</b>	<b>0.059</b>	<b>0.061</b>
<b>006</b>	<b>0.010</b>	<b>0.010</b>	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	<b>0.095</b>	<b>0.095</b>	<b>0.071</b>	<b>0.068</b>	<b>0.033</b>	<b>0.036</b>	<b>0.016</b>	<b>0.016</b>	<b>0.011</b>	<b>0.011</b>	<b>0.044</b>	<b>0.043</b>
<b>00701</b>	<b>0.339</b>	<b>0.344</b>	<b>0.289</b>	<b>0.309</b>	<b>0.369</b>	<b>0.389</b>	<b>0.440</b>	<b>0.460</b>	<b>0.427</b>	<b>0.428</b>	<b>0.193</b>	<b>0.194</b>	<b>0.109</b>	<b>0.120</b>	<b>0.193</b>	<b>0.194</b>
<b>009</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	<b>0.056</b>	<b>0.057</b>	<b>0.012</b>	<b>0.022</b>	<b>0.068</b>	<b>0.068</b>
<b>010</b>	<b>0.010</b>	<b>0.010</b>	<b>0.099</b>	<b>0.099</b>	<b>0.124</b>	<b>0.127</b>	<b>0.071</b>	<b>0.074</b>	<b>0.153</b>	<b>0.159</b>	<b>0.053</b>	<b>0.053</b>	<b>0.141</b>	<b>0.141</b>	<b>0.084</b>	<b>0.083</b>
<b>01101</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.021</b>	<b>0.024</b>	0.000	0.000	<b>0.029</b>	<b>0.029</b>
<b>015</b>	<b>0.026</b>	<b>0.028</b>	<b>0.020</b>	<b>0.020</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.008</b>	<b>0.008</b>	<b>0.033</b>	<b>0.033</b>	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>
<b>019</b>	0.000	0.000	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.015</b>	<b>0.014</b>
<b>023</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>028</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>
<b>038</b>	0.000	0.000	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.021</b>	<b>0.020</b>	<b>0.109</b>	<b>0.109</b>	<b>0.026</b>	<b>0.025</b>
<b>043</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>
<b>055</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	<b>0.015</b>	<b>0.014</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>null</b>	<b>0.015</b>	0.000	<b>0.050</b>	0.000	<b>0.045</b>	0.000	<b>0.035</b>	<b>0.011</b>	<b>0.015</b>	0.000	<b>0.015</b>	<b>0.024</b>	<b>0.051</b>	0.000	<b>0.019</b>	0.000

a = corrected frequencies; b = uncorrected frequencies

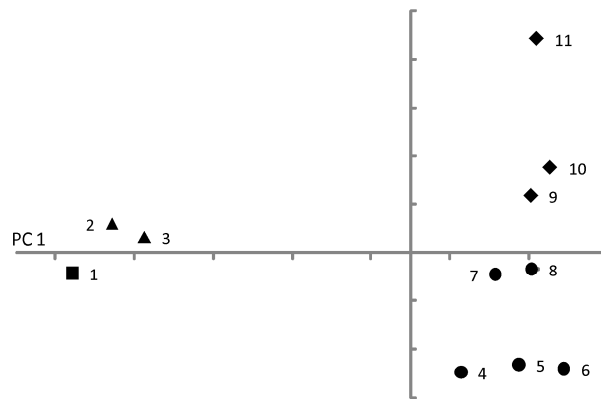
**Table 4** Estimated allele frequencies by EM algorithm.



**Figure 1 The exon-intron organization of the *KIR3DL2* gene.** Numbers represent the length in base pairs (bp) of exons (boxes) and introns (dashes). The correlation between the exons and the domains of the mature protein are shown at the bottom. The figure is not to scale.



**Figure 2 Neighbor-joining dendrogram with eleven populations.** Numbers on branches represent indexes, in percentage, of bootstrap by 10000 replicates.



**Figure 3 Principal component analyzes**

1=Campo Grande; 2=Ireland; 3=Curitiba; 4=GRC; 5=KRC; 6=KIV; 7=GND; 8=GKW; 9=China; 10=Ori-BR; 11=Japan

## 6. DISCUSSÃO GERAL

### 6.1 AUSÊNCIA E PRESENÇA DE *KIR* E SEUS LIGANTES EM POPULAÇÕES

A primeira etapa desse trabalho foi a descrição detalhada do polimorfismo de ausência e presença de *KIR* na população de Curitiba. Também descrevemos a diversidade de ligantes HLA além dos alelos de *KIR2DL4*. Nesse primeiro trabalho, já publicado, foi ainda verificado se havia indícios de coevolução *KIR*-ligante, através de correlação de frequências. Como esperado, Curitiba não difere significativamente de populações européias ou euro-descendentes. No entanto, muitas populações do Brasil não foram investigadas e são poucos os resultados publicados descrevendo a diversidade de *KIR* em indígenas. Apesar da semelhança de Curitiba com outras populações de semelhante ancestralidade, o trabalho trouxe contribuições significativas para a compreensão dessa família gênica: 1) embora existam várias populações brasileiras descritas para as frequências gênicas desse complexo, a maior parte desses estudos não apresenta enfoque de genética de populações, sendo apenas descrição de frequências gênicas de controles de estudos de associação com doenças (FRANCESCHI *et al.*, 2008; JOBIM, M. *et al.*, 2008). Além disso, 2) nenhum outro trabalho descreve as frequências alélicas de *KIR2DL4* em alta resolução para populações do Brasil. Belo Horizonte, única população brasileira descrita para *KIR2DL4* (MIDDLETON *et al.*, 2008), foi genotipada através de oligonucleotídeos-sonda de sequência específica (PCR-SSOP), método que nós mostramos não ter resolução necessária para a distinção entre quatro pares de alelos, o que causou estimativa errônea de frequências alélicas e interpretação incorreta de resultados naquele estudo. Essa distinção é relevante, uma vez que a análise de possíveis variações funcionais entre produtos de diferentes alelos é obviamente dependente de genotipagem precisa. Os alelos envolvidos nessas ambiguidades apresentam uma deleção que causa um erro de matriz de leitura, gerando um receptor não funcional de alta frequência populacional. A correta estimativa desses alelos fornece subsídios para a compreensão da função desse gene. Mais detalhes são mostrados e discutidos no corpo do trabalho (AUGUSTO *et al.*, 2012). Não encontramos evidências de coevolução a partir das frequências de genes *KIR* e da presença seus ligantes HLA, o que não é inesperado, uma vez que a população deveria estar sobre o efeito de uma seleção muito intensa para apresentar desvios com a abordagem utilizada neste trabalho. No entanto, uma contribuição importante acerca do estudo dos ligantes é que a frequência de epítomos Bw4 provenientes



do loco *HLA-A* teve frequência igualmente alta, comparada à frequência de Bw4 provenientes do loco *HLA-B*. Embora já tenha sido demonstrado que epítomos Bw4 provenientes de *HLA-A* são reconhecidos por KIR3DL1/S1 (THANANCHAI *et al.*, 2007), eles são rotineiramente pouco valorizados nos trabalhos de interação ligante – receptor ou, não é dada a eles igual importância como para os epítomos Bw4 do loco *HLA-B*. Sugerimos, pela primeira vez, que esses dois locos HLA são igualmente importantes para reconhecimento pelos receptores KIR3DL1/S1.

## 6.2 AUSÊNCIA E PRESENÇA DE KIR E SEUS LIGANTES EM PENFIGO FOLIÁCEO

O polimorfismo de ausência e presença, assim como combinações *KIR-HLA* foram associados com a susceptibilidade diferencial ao pênfigo foliáceo (PF). Esse trabalho, já submetido para publicação, traz um resultado surpreendente, porém bastante consistente. Ao passo que na maior parte das associações encontradas para doenças autoimunes os genes *KIR* ativadores são apresentados como fatores de risco (pág. 73), esses mesmos genes apresentaram uma ação protetora contra o desenvolvimento de PF. Pênfigo foliáceo tem uma documentada influência ambiental que desencadeia a doença em indivíduos geneticamente susceptíveis (AOKI *et al.*, 2004; LOMBARDI *et al.*, 1992). A infecção por micro-organismos durante a picada de um simuliídeo já foi sugerida (EATON *et al.*, 1998). Dessa forma, propomos que o mecanismo básico de reconhecimento KIR (reconhecimento de patógenos, ativação de célula NK e lise celular) estaria diminuindo o impacto dos fatores ambientais no desenvolvimento da doença. Aqueles indivíduos que possuem um repertório mais amplo de genes ativadores e que por isso, reconhecem um maior número de patógenos (ou reconhecem um patógeno com maior eficiência), eliminariam de forma mais eficiente o(os) supostos patógeno(s) desencadeador(es) da doença. É interessante ressaltar que pênfigo foliáceo se distingue das demais doenças autoimunes pela endemicidade e pelo envolvimento de fatores ambientais de maneira tão evidente.

Petzl-Erlar e Santamaria (1989), de maneira pioneira, sugeriram que o polimorfismo de HLA classe II influencia na patogênese de PF. Esses resultados foram corroborados mais tarde, mostrando consistência nos resultados (PAVONI *et al.*, 2003). Outra grande contribuição do trabalho de associação desenvolvido nessa tese é que nunca antes foi demonstrada a importância de HLA classe I para a patogênese de PF, apesar de ter sido observada uma associação com *HLA-B16* (OR = 4, p = 0,035; Petzl-Erlar e Santamaria, 1989).

Naquele momento, não foi dada maior importância a esse resultado, devido ao valor de *P* relativamente elevado, ao forte desequilíbrio de ligação entre genes HLA, e às associações com *HLA-DR* e *HLA-DQ* terem sido mais significativas. Ficou claro nos nossos resultados (págs. 72, 77 e 79) que os ligantes HLA de classe I têm uma importância tanto no que se refere ao reconhecimento KIR, como também devem participar através de vias alternativas. Essa conclusão se dá por dois motivos: 1) a associação significativa de HLA-Bw4(80T), sabidamente menos importante para o reconhecimento KIR que HLA-Bw4(80I), indicando que essa molécula interfere na patogênese de PF não somente no que diz respeito ao reconhecimento KIR; 2) a associação com os pares *KIR-HLA* foram mais fortes que os dois isoladamente; o mesmo aconteceu para o par *3DS1-HLA-Bw4(80T)*, indicativo de que HLA-Bw4(80T) pode ser mais importante para o reconhecimento *KIR* do que se acredita.

Esses resultados nos motivam a prosseguir a investigação da diversidade alélica de *KIR* e também dos genes *HLA* classe I em PF. Além disso, aspectos como a diferença de expressão gênica entre pacientes e controles e a variação de número de cópias de genes *KIR* devem ser analisados.

### 6.3 MÉTODO DE GENOTIPAGEM DE *KIR3DL2*

Nós descrevemos e implementamos um método eficaz de genotipagem para *KIR3DL2*. Existe apenas um método de genotipagem deste gene em alta resolução descrito na literatura (GEDIL *et al.*, 2007). Apesar de eficaz na distinção de alelos, trata-se de um método de difícil otimização e de alto custo. O motivo disso se dá pelo fato de ser baseado em amplificação de fragmentos de grande tamanho (7 a 15kb). Amplificar fragmentos menores, como descrevemos, além de ser mais fácil e rápido, apresenta maiores chances de sucesso, principalmente quando trabalhamos com DNA degradado ou de qualidade mediana. Além disso, o custo de enzimas de polimerização de alta fidelidade requeridas para amplificação de grandes segmentos de DNA chega a ser 500% mais elevado.

O método que descrevemos nesse trabalho é baseado no sequenciamento dos exons 3, 4, 5, 8 e 9, além do íntron 7. Devido ao não sequenciamento dos exons 1 e 2, o único alelo que não conseguimos genotipar em alta resolução é o *KIR3DL2\*002*. No passo posterior a essa etapa, sequenciaremos não somente os exons, mas também os íntrons 1 e 2. Com esses segmentos, além de maior informação para o alelo *KIR3DL2\*002*, os íntrons permitirão que eliminemos a necessidade de PCR-SSP para resolução da maior parte, ou talvez todas as

ambiguidades. Nós produzimos um kit de oligonucleotídeos específicos para PCR-SSP para resolver as ambigüidades mais frequentes e, embora mais barato, esse método pode apresentar resultados questionáveis quando amplificamos mais que 1 Kb a partir de DNA de baixa qualidade. Dessa maneira, validaremos nossos resultados obtidos por PCR-SSP a partir do posterior seqüenciamento. Ainda, a PCR-SSP poderá ser apresentada como uma opção mais barata do que o sequenciamento de íntrons para resolução de ambiguidades. Além disso, sequenciar esses íntrons também será importante porque essa informação está disponível para apenas 22 dos 84 alelos descritos no *Immuno Polymorphism Database* – IPD (ROBINSON *et al.*, 2010). Dessa maneira, poderemos contribuir com novas informações, mesmo para os alelos já descritos que têm apenas a região codificadora confirmada.

Após a validação dos novos protocolos a partir de oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento dessas novas regiões, esse manuscrito será submetido a um periódico especializado em protocolos em biologia molecular, uma vez que consideramos que o novo método contribui significativamente ao estudo de diversidade alélica do gene *KIR3DL2*.

#### 6.4 ALELOS DE *KIR3DL2* EM POPULAÇÕES E EM PÊNFIGO FOLIÁCEO

A análise do gene *KIR3DL2* em populações indígenas e urbanas brasileiras revelou alta diversidade alélica em populações urbanas. Alelos anteriormente não descritos para populações euro-descendentes foram encontrados, principalmente pelo fato da metodologia aqui aplicada permitir genotipagem de alta resolução. Como já discutido no artigo “*Characterization of the highly polymorphic KIR3DL2 in Amerindian and urban Brazilian populations: ten new alleles were found*” (pág. 104), dúvidas a respeito dos alelos *3DL2\*008* e *3DL2\*038* precisam ser esclarecidas. O alelo *3DL2\*008*, embora não tenha sido detectado qualquer de nossas populações, foi descrito em outras populações, sendo alta sua frequência em orientais. Entretanto, encontramos o alelo *KIR3DL2\*038* com frequências semelhantes à de *3DL2\*008* nessas populações. Devido à semelhança na região codificadora desses dois alelos, acreditamos que eles possam estar sendo confundidos em trabalhos que utilizam baixa resolução de genotipagem, até porque *3DL2\*038* foi descrito recentemente. Essa questão nos mostra a necessidade de análise por sequenciamento para revelar a verdadeira diversidade do loco *KIR3DL2*.

A não detecção da ausência de *KIR3DL2* (chamada a partir de agora de alelo nulo), não trouxe distorção significativa das frequências alélicas (pág. 117). Porém, ela pode ter

sido causadora do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrado. Até o momento, esse gene era considerado presente em todos os indivíduos, com possíveis raras exceções. Entretanto, a frequência de ausência desse gene parece ser mais pronunciada do que inicialmente se acreditava (estimamos frequência alélica de 0,05 em populações indígenas). No entanto, de acordo com as frequências estimadas para esse alelo nulo e o tamanho amostral, não seria esperado encontrar indivíduos homozigotos, como de fato não encontramos.

Vários genes do sistema imune apresentam evidências de estarem evoluindo sob seleção natural (ANDRÉS *et al.*, 2009). Dentre esses, estão os genes *KIR* para os quais estudos recentes mostram evidências de seleção direcional e balanceadora (GUINAN *et al.*, 2010; NORMAN *et al.*, 2007). Embora não tenham sido documentadas evidências da seleção natural para o gene *KIR3DL2* (HOU *et al.*, 2011), ainda são poucas as populações para as quais a hipótese de neutralidade seletiva foi testada, sendo nenhuma indígena. Realizamos testes evolutivos para verificar indícios de seleção natural na região codificadora desse gene. Para essas análises, duas categorias de dados foram utilizadas: 1) frequências alélicas obtidas diretamente a partir da genotipagem, mesmo com algumas populações apresentando significativo desequilíbrio de Hardy-Weinberg; 2) com as frequências corrigidas a partir do algoritmo de expectativa e maximização (EM) (DEMPSTER *et al.*, 1977) que corrige as frequências considerando que as populações estão em equilíbrio de Hardy Weinberg e que existe um alelo não detectado. O objetivo dessas duas comparações foi verificar o quanto a não detecção do alelo nulo interferiria na interpretação dos resultados e nas conclusões.

Utilizamos dois métodos para testar a hipótese de neutralidade: Ewens-Watterson (WATTERSON, 1978) e D de Tajima (TAJIMA, 1989). No teste de Ewens-Watterson, a taxa de homozigose esperada ( $F_{esp}$ ), que é derivada de simulação baseada na teoria de amostragem de alelos sob neutralismo (EWENS, 1972) é comparada à taxa de homozigose observada ( $F_{obs}$ ). Valores de  $F_{obs}$  significativamente maiores que  $F_{esp}$  são compatíveis com a presença de poucos alelos em alta frequência, seguidos de vários outros em frequências baixas, situação gerada por fenômenos tais como a seleção direcional e/ou expansão populacional. Por outro lado, valores de  $F_{obs} < F_{esp}$  são compatíveis com seleção balanceadora ou efeitos demográficos tais como gargalo populacional recente ou estruturação. Já o D de Tajima (TAJIMA, 1989), compara dois estimadores de parâmetro  $\Theta$  ( $4N\mu$ ). N representa o tamanho populacional e  $\mu$

a taxa de mutação. Os estimadores são a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), o número médio de diferenças par a par entre as sequências ( $\Theta\pi$ ) além dos sítios segregantes ( $\Theta S$ ). Segundo Tajima, não há diferenças entre esses dois estimadores de  $\Theta$  quando a região analisada está evoluindo de modo neutro. Dessa maneira, valores positivos de  $D$  são compatíveis com a atuação de seleção balanceadora ou gargalo populacional, ao passo que valores negativos estão de acordo com a atuação da seleção purificadora ou direcional, além de expansão da população. Os resultados para esses dois testes, comparando as frequências alélicas e corrigidas pelo algoritmo EM são mostradas logo a seguir, na TABELA 2.

Primeiramente, é interessante notar que os resultados são muito semelhantes, antes e após correção de frequências, indicando que a não detecção do alelo nulo não interferiu de maneira significativa nas conclusões. Exceto para GRC, não obtivemos nenhum resultado significativo para o teste de Ewens-Watterson. GRC apresentou um  $F_{obs}$  significativamente inferior ao  $F_{esp}$  para esse teste ( $P < 0.01$ ). Por outro lado, GRC e GKW apresentaram valores de  $D$  positivos e significativos. Esses resultados poderiam ser interpretados como evidência de seleção balanceadora ou efeito de gargalo populacional. Analisando os alelos dessas populações, vemos duas linhagens que ocorrem em alta frequência, *KIR3DL2\*002* e *KIR3DL2\*007*, que apresentam três diferenças nucleotídicas entre si. Em GRC, as diferenças entre esses dois alelos correspondem aos únicos três sítios polimórficos encontrados na população. Esse padrão provavelmente influiu a estatística  $D$ , pois causou um incremento no componente da diversidade nucleotídica do teste, criando o desvio que captamos. As populações asiáticas apresentam os alelos *KIR3DL2\*002* e *KIR3DL2\*007* em frequências elevadas (GONZALEZ-GALARZA *et al.*, 2011). O efeito fundador associado à ocupação das Américas a partir da Ásia provavelmente levou à perda dos alelos menos frequentes, explicando os padrões que observamos nas populações ameríndias estudadas: um número pequeno de alelos com frequências intermediárias. Portanto, devido à ausência de evidências de seleção natural em outros estudos e apenas duas das cinco populações indígenas terem se mostrado com valores de  $D$  positivo, sugerimos que efeitos demográficos relacionados à origem dessas populações contribuíram para a geração dos padrões de diversidade e de supostos desvios de neutralidade que obtivemos. Entretanto, outras populações Ameríndias devem ser estudadas para melhor compreensão dessa questão.

**Tabela 2 Testes de neutralidade seletiva**

População	Ewens-Watterson			D de Tajima	
	n	F <sub>obs</sub>	F <sub>esp</sub>	P	D de Tajima
GKW	144	0.427	0.435	0.569	<b>2.080</b>
GKW*		0.428	0.439	0.556	<b>2.078</b>
GND	76	0.320	0.324	0.576	0.125
GND*		0.317	0.325	0.587	0.108
GRC	63	0.256	0.501	<b>0.017</b>	<b>2.542</b>
GRC*		0.253	0.503	<b>0.011</b>	<b>2.538</b>
KRC	88	0.367	0.410	0.457	0.921
KRC*		0.366	0.408	0.464	0.908
KIV	68	0.343	0.443	0.291	1.265
KIV*		0.343	0.444	0.309	1.265
Ori-BR	46	0.311	0.299	0.649	-0.112
Ori-BR*		0.319	0.289	0.710	-0.165
Curitiba	125	0.151	0.224	0.161	0.219
Curitiba*		0.150	0.224	0.127	0.219
C. Grande	141	0.136	0.202	0.145	-0.054
C. Grande*		0.138	0.199	0.178	-0.064

n = tamanho populacional; Fobs = frequência observada; Fesp = frequência esperada; P = valor de significância. \* Frequências estimadas pelo algoritmo EM (DEMPSTER et al., 1977).

Ainda em relação à não detecção do alelo nulo, embora não interfira nas interpretações dos resultados dos testes de neutralidade, é interessante questionar se poderia ter algum efeito nos resultados do estudo de associação entre o polimorfismo alélico de *KIR3DL2* e o pênfigo foliáceo. A própria diferença quase imperceptível entre as frequências alélicas corrigidas e não corrigidas (pág. 117) já é um primeiro indicativo que o alelo nulo não resulta em distorção significativa desses resultados. Além disso, *KIR3DL2\*001* foi mais frequente em pacientes tanto em número de cópias alélicas como também em frequências de portadores. Mesmo que a falha de detecção do alelo nulo em alguns indivíduos pudesse alterar significativamente as frequências alélicas, não alteraria o fato de o alelo *KIR3DL2\*001* estar presente em um maior número de indivíduos do grupo de pacientes. Além disso, o genótipo *KIR3DL2\*001/KIR3DL2\*001* está mais fortemente associado ao PF, não apenas corroborando que o alelo interfere na susceptibilidade ao pênfigo foliáceo, mas também revelando um possível efeito aditivo desse alelo. Em sequência a esse trabalho, verificaremos se haplótipos sem o gene *KIR3DL2* de fato existem, fato nunca demonstrado em qualquer trabalho até agora publicado. Embora tenham sido relatados em estudos publicados indivíduos que apresentaram ausência de *KIR3DL2* (EWERTON *et al.*, 2007; FIALHO *et al.*, 2009; MIYASHITA *et al.*, 2006; MOGAMI *et al.*, 2007) isso pode ser fruto do híbrido *KIR3DL1/2v*, cuja região telomérica corresponde ao gene *KIR3DL2* e sua porção centromérica ao gene *KIR3DL1* (NORMAN *et al.*, 2009). Esses indivíduos, quando genotipados por PCR-SSP (oligonucleotídeos de sequência específica) ou PCR-SSOP (oligonucleotídeos-sonda de sequência específica), métodos utilizados na grande maioria dos trabalhos realizados, apresentam resultados negativo para *KIR3DL2*, uma vez que os oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados hibridizam na polimórfica porção centromérica (exons 3, 4 e 5). Dessa maneira, não podemos afirmar, com base nos resultados da literatura, que haplótipos sem o gene *KIR3DL2* existem. Por outro lado, considerando que *KIR3DL1/2v* foi descrito apenas em africanos ou afro-descendentes (NORMAN *et al.*, 2009) e que indivíduos negativos para *KIR3DL2* não são raros em asiáticos (MIYASHITA *et al.*, 2006), indígenas (EWERTON *et al.*, 2007) e europeus (GONZALEZ-GALARZA *et al.*, 2011), além dos desvios no equilíbrio de Hardy Weinberg encontrados nas nossas populações indígenas e asiática, propomos que haplótipos sem *KIR3DL2* existam em frequências mais elevadas do que tem sido considerado ao redor do mundo. Essa comprovação, objetivo posterior a esse trabalho, pode ser impactante na maneira de

interpretar os resultados, uma vez que isso pode levar a desvios de frequências, que mesmo não sendo significantes, podem alterar o equilíbrio de Hardy Weinberg. Além disso, a frequência desse alelo nulo pode estar relacionada a grupos étnicos específicos, podendo ser alta em indígenas devido a, por exemplo, fatores demográficos relacionados à origem dessas populações. Em curto prazo, iremos selecionar todos os indivíduos supostamente homozigotos encontrados nesse trabalho e quantificar o número de cópias do gene *3DL2* por PCR em tempo real, para podermos estimar de maneira absoluta quantos haplótipos sem *KIR3DL2* existem em nossa amostra. Interessante ressaltar que, funcionalmente, os portadores de *KIR3DL1/2v* de fato não têm *KIR3DL2*, uma vez que seus domínios extracelulares na superfície celular são equivalentes a *KIR3DL1*.

A hipótese apresentada no manuscrito "*KIR3DL2 alleles are associated to differential susceptibility to the autoimmune disease pemphigus foliaceus*" (pág. 91) de que o alelo *1190T* diminui o poder de inibição *KIR3DL2* nunca foi testada. Essa hipótese é baseada nos resultados anteriores e presentes no artigo já submetido para publicação "*Activating KIR and their HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering disease of skin*" (pág 55). Neste trabalho, mostramos que um maior número de genes ativadores ou maior razão ativadores/inibidores apresentam efeito protetor contra PF. A diferença do poder inibidor causada pela variação alélica poderia explicar a razão do alelo *KIR3DL2\*001* estar associado, já que não tendo o SNP *1190T* apresentaria um poder inibidor mais forte. Também em curto prazo, pretendemos testar essa hipótese. Parte desse processo já foi realizada (implementação de método de separação de células NK a partir de sangue periférico, seleção de indivíduos com genótipos informativos, realização de testes de ensaios de citotoxicidade), em colaboração com outro aluno de doutorado com tese em andamento. O projeto consiste em separar células que possuam *KIR3DL2* em sua superfície, com genótipos conhecidos, através de separação direta ou indireta com auxílio de anticorpos conjugados a microesferas magnéticas e, após, realizar ensaios de citotoxicidade contra um painel de células que possuam ligantes KIR, inclusive os alótipos HLA-A3 e HLA-A11. Dessa maneira, será possível tentar explicar a razão da associação, o que poderia trazer contribuições expressivas, não somente a esse trabalho, como para a compreensão dos mecanismos de reconhecimento de KIR em aspecto mais amplo. Pouco se sabe, até o momento, através de quais mecanismos a diversidade alélica de *KIR* pode interferir na patogênese de doenças.



Descrevemos novos alelos de *KIR3DL2*. No entanto, apenas consideramos confirmados aqueles que foram encontrados em homozigose, sem ambiguidades em mais de um indivíduo, ou ainda clonados e sequenciados isoladamente. A clonagem de todos os demais alelos é prevista como etapa posterior a esse trabalho, para que recebam nomes oficiais e que esse resultado possa ser publicado.

Fica claro, a partir dos resultados obtidos nesse trabalho, que estudos populacionais são importantes para fornecer subsídios para estudos envolvendo doenças. Não somente, a implementação de um método de genotipagem de *KIR3DL2* de alta resolução, como o que apresentamos nesse trabalho, é um pré-requisito para estudos sobre o papel desses alelos em doenças. A ausência de informações provenientes de estudos populacionais pode levar a uma compreensão errônea do papel dos genes numa situação de patologia.

## 7. CONCLUSÕES

- A população de Curitiba, embora miscigenada, é semelhante a populações europeias no que se refere à diversidade de genes *KIR*;
- *HLA-A* e *HLA-B* parecem contribuir igualmente como ligantes de receptores *KIR*, uma vez que a frequência do epítipo Bw4 é elevada para ambos;
- Não foram encontradas evidências de coevolução de *KIR* e *HLA* em relação a correlações de frequências de presença dos genes *KIR* e presença de epítopos Bw4, Bw6, C1 e C2;
- Ao contrário das demais doenças autoimunes, os genes ativadores e a função ativadora de *KIR* contribuem para uma menor susceptibilidade ao PF, provavelmente devido à importância de fatores ambientais nessa doença;
- *HLA* classe I (epítopos Bw4) interfere na susceptibilidade ao PF, seja combinado com *KIR* ou isoladamente;
- Implementamos uma metodologia confiável para genotipagem de *KIR3DL2* em alta resolução. No entanto, continuaremos trabalhando para uma genotipagem ainda mais precisa;
- O alelo *KIR3DL2\*001* está positivamente associado a PF e uma associação negativa foi encontrada para o SNP 1190T, que possivelmente diminui a atividade inibidora do receptor;
- *KIR3DL2* apresentou alta diversidade alélica nas populações urbanas estudadas. Pela primeira vez, descrevemos as frequências alélicas para populações ameríndias;
- Dezesesseis novos alelos de *KIR3DL2* foram encontrados. Alguns já estão confirmados e outros devem ser submetidos à confirmação para posterior publicação;
- As populações indígenas sofreram redução da diversidade alélica de *KIR3DL2*, provavelmente devido ao efeito fundador desde a migração das populações ancestrais asiáticas para a América e durante a ocupação do continente.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho teve colaboração com o National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, MD – USA, que financiou parte da etapa de sequenciamento de alelos *KIR* ao abrir as portas para que essa etapa do trabalho laboratorial fosse ali realizada. De maneira semelhante, o Laboratório de Imunogenética da UFPR financiou as tipagens HLA e permitiu que realizássemos a genotipagem lá.

O polimorfismo de *KIR* é incomum em comparação ao que conhecemos para a maior parte dos genes, o que torna seu estudo mais complexo. Acreditamos que apenas pouco dessa diversidade ainda é conhecida e muitos outros mecanismos acerca do papel e evolução desses genes serão descobertos.

Trabalhos de associação, como os realizados nesse estudo, remetem à complexidade de genes do sistema imune e da relação deles com doenças. Ao passo que alguns variantes genéticos podem aumentar o risco de desenvolvimento da maior parte das doenças autoimunes, em outro contexto, esses mesmos variantes podem agir de maneira protetora. Essas peculiaridades tornam difícil a compreensão do papel desses genes e deixam essa missão ainda mais desafiadora. Por outro lado, a motivação maior desses estudos se dá pelo compromisso com a sociedade, anseio de entender cada vez mais e, quem sabe, contribuir de maneira direta ou indireta para o tratamento de milhares de pacientes que infelizmente sofrem com pênfigo, uma doença ignorada pela maior parte da população brasileira, mas que causa sofrimento inimaginável.

## 9. REFERÊNCIAS

- ANDRÉS, A. M.; HUBISZ, M. J.; INDAP, A. *et al.* Targets of balancing selection in the human genome. **Molecular biology and evolution**, v. 26, n. 12, p. 2755-64, dez 2009.
- ANHALT, G. J. Making sense of antigens and antibodies in pemphigus. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 40, n. 5 Pt 1, p. 763-6, maio 1999.
- AOKI, V.; MILLIKAN, R. C.; RIVITTI, E. A. *et al.* Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The journal of investigative dermatology**, v. 9, n. 1, p. 34-40, jan 2004.
- AUGUSTO, D. G.; ZEHNDER-ALVES, L.; PINCERATI, M. R. *et al.* Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population. **Immunogenetics**, v. 64, p. 143-152, 18 ago 2012.
- BALLAS, Z. K.; RASMUSSEN, W. L.; KRIEG, A. M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. **Journal of immunology**, v. 157, n. 5, p. 1840-5, 1 set 1996.
- BIRON, C. A.; BROSSAY, L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. **Current opinion in immunology**, v. 13, n. 4, p. 458-64, ago 2001.
- BIRON, C. A.; NGUYEN, K. B.; PIEN, G. C.; COUSENS, L. P.; SALAZAR-MATHER, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annual review of immunology**, v. 17, p. 189-220, jan 1999.
- BOYSON, J. E.; ERSKINE, R.; WHITMAN, M. C. *et al.* Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16180-5, 10 dez 2002.
- BROWN, M. G.; SCALZO, A. A.; STONE, L. R. *et al.* Natural killer gene complex (Nkc) allelic variability in inbred mice: evidence for Nkc haplotypes. **Immunogenetics**, v. 53, n. 7, p. 584-91, set 2001.
- CAMPBELL I.; REIS V.; AOKI V. *et al.* Pênfigo foliáceo endêmico/fogo selvagem. **Annal Dermatology**; 76(1):13-33, 2001.
- CARR, W. H.; PANDO, M. J.; PARHAM, P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. **Journal of immunology**, v. 175, n. 8, p. 5222-9, 15 out 2005.
- CELLA, M.; LONGO, A.; FERRARA, G. B.; STROMINGER, J L; COLONNA, M. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 4, p. 1235-42, 1 out 1994.
- CHING, C.; LOPEZ, C. Natural killing of herpes simplex virus type 1-infected target cells: normal human responses and influence of antiviral antibody. **Infection and immunity**, v. 26, n. 1, p. 49-56, out 1979.
- COOK, M. A.; MILLIGAN, D. W.; FEGAN, C. D. *et al.* The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. **Blood**, v. 103, n. 4, p. 1521-6, 15 fev 2004.

CRUM, K. A.; LOGUE, S. E.; CURRAN, M. D.; MIDDLETON, D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. **Tissue antigens**, v. 56, n. 4, p. 313-26, out 2000.

DEMPSTER, A. P.; LAIRD, N. M.; ROBIN, D. B. Maximum likelihood from incomplete data via the em algorithm (with discussion). *Journal of Royal Statistical Society B* 39: 1–38, 1977.

DENIS, L.; SIVULA, J.; GOURRAUD, P.-A. *et al.* Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Réunion. **Tissue antigens**, v. 66, n. 4, p. 267-76, out 2005.

EATON, D. P.; DIAZ, L. A.; HANS-FILHO, G. *et al.* Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **Journal of medical entomology**, v. 35, n. 2, p. 120-31, mar 1998.

EWENS, W. J. The sampling theory of selectively neutral alleles. **Theoretical population biology**, v. 3, n. 1, p. 87-112, mar 1972.

EWERTON, P. D.; LEITE, M. M.; MAGALHÃES, M.; SENA, L.; SANTOS, E. J. M. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. **Immunogenetics**, v. 59, n. 8, p. 625-30, ago 2007.

FAURE, M.; LONG, ERIC O. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. **Journal of immunology**, v. 168, n. 12, p. 6208-14, 15 jun 2002.

FIALHO, R. N.; MARTINS, L.; PINHEIRO, J. P. *et al.* Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors, and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis. **Human immunology**, v. 70, n. 11, p. 915-20, nov 2009.

FLODSTRÖM, M.; SHI, F.-D.; SARVETNICK, N.; LJUNGGREN, H.-G. The natural killer cell -- friend or foe in autoimmune disease? **Scandinavian journal of immunology**, v. 55, n. 5, p. 432-41, maio 2002.

FRANCESCHI, D. S. A.; MAZINI, P. S.; RUDNICK, C. C. C. *et al.* Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. **Tissue antigens**, v. 72, n. 5, p. 478-82, nov 2008.

FRENCH, A. R.; YOKOYAMA, WAYNE M. Natural killer cells and autoimmunity. **Arthritis research & therapy**, v. 6, n. 1, p. 8-14, jan 2004.

FUTAMURA, S.; MARTINS, C.; RIVITTI, E A; *et al.* Ultrastructural studies of acantholysis induced in vivo by passive transfer of IgG from endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem). **The Journal of investigative dermatology**, v. 93, n. 4, p. 480-5, out 1989.

GARDINER, C M; GUETHLEIN, L A; SHILLING, H G; *et al.* Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. **Journal of immunology**, v. 166, n. 5, p. 2992-3001, 1 mar 2001.

GEDIL, M. A.; STEINER, N K; HURLEY, C K. KIR3DL2: diversity in a hematopoietic stem cell transplant population. **Tissue antigens**, v. 70, n. 3, p. 228-32, set 2007.

GONZALEZ-GALARZA, F. F.; CHRISTMAS, S.; MIDDLETON, DEREK; JONES, A. R. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. **Nucleic acids research**, v. 39, n. Database issue, p. D913-9, jan 2011.

GOODRIDGE, J. P.; LATHBURY, L. J.; STEINER, NORIKO K; *et al.* Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. **European journal of immunology**, v. 37, n. 1, p. 199-211, jan 2007.

GOODRIDGE, J. P.; WITT, CAMPBELL S; CHRISTIANSEN, FRANK T; WARREN, HILARY S. KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells. **Journal of immunology**, v. 171, n. 4, p. 1768-74, 15 ago 2003.

GRAEF, T.; MOESTA, A. K.; NORMAN, PAUL J; *et al.* KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A\*11 while diminishing avidity for HLA-C. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 11, p. 2557-72, 26 out 2009.

GUINAN, K. J.; CUNNINGHAM, R. T.; MEENAGH, A. *et al.* Signatures of natural selection and coevolution between killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and HLA class I genes. **Genes and immunity**, v. 11, n. 6, p. 467-78, set 2010.

GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, M. E.; SANDOVAL-RAMÍREZ, L.; DÍAZ-FLORES, M. *et al.* KIR gene in ethnic and Mestizo populations from Mexico. **Human immunology**, v. 67, n. 1-2, p. 85-93, [S.d.].

GÓMEZ-LOZANO, N.; GARDINER, CLAIR M.; PARHAM, P.; VILCHES, C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. **Immunogenetics**, v. 54, n. 5, p. 314-9, ago 2002.

HANSASUTA, P.; DONG, T.; THANANCHAI, H. *et al.* Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. **European journal of immunology**, v. 34, n. 6, p. 1673-9, jun 2004.

HOU, L.; JIANG, B.; CHEN, M.; NG, J.; HURLEY, CAROLYN, K. The characteristics of allelic polymorphism in killer-immunoglobulin-like receptor framework genes in African Americans. **Immunogenetics**, v. 63, n. 9, p. 549-59, set 2011.

HSU, K. C.; LIU, X.-R.; SELVAKUMAR, A. *et al.* Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. **Journal of immunology**, v. 169, n. 9, p. 5118-29, 1 nov 2002.

ISAKOV, N. Role of immunoreceptor tyrosine-based activation motif in signal transduction from antigen and Fc receptors. **Advances in immunology**, v. 69, p. 183-247, jan 1998.

JIANG, K.; ZHU, F.-M.; LV, Q.-F.; YAN, L.-X. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. **Tissue antigens**, v. 65, n. 6, p. 556-63, jun 2005.

JOBIM, M.; JOBIM, L. F. J.; SALIM, P. H. *et al.* A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a Caucoid Brazilian population with psoriasis vulgaris. **Tissue antigens**, v. 72, n. 4, p. 392-6, out 2008.

JONCAS, J.; MONCZAK, Y.; GHIBU, F. *et al.* Brief report: killer cell defect and persistent immunological abnormalities in two patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. **Journal of medical virology**, v. 28, n. 2, p. 110-7, jun 1989.

KARLHOFER, F. M.; RIBAUDO, R. K.; YOKOYAMA, W. M. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 66-70, 2 jul 1992.

KHAKOO, S. I.; RAJALINGAM, R.; SHUM, B. P. *et al.* Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. **Immunity**, v. 12, n. 6, p. 687-98, jun 2000.

KHAKOO, S. I.; CARRINGTON, M. KIR and disease: a model system or system of models? **Immunological reviews**, v. 214, p. 186-201, dez 2006.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; PROSS, H.; WIGZELL, H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. **European journal of immunology**, v. 5, n. 2, p. 117-21, fev 1975.

KIKUCHI-MAKI, A.; YUSA, S.-ICHI; CATINA, T. L.; CAMPBELL, K. S. KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. **Journal of immunology**, v. 171, n. 7, p. 3415-25, 1 out 2003.

KULKARNI, S.; MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M. KIR genotyping by multiplex PCR-SSP. **Methods in molecular biology**, v. 612, p. 365-75, jan 2010.

KÄRRE, K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. **Scandinavian journal of immunology**, v. 55, n. 3, p. 221-8, mar 2002.

LI, N.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; RIVITTI, E. A.; DIAZ, L. A. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 11, p. 1501-10, 2 jun 2003.

LJUNGGREN, H. G.; OHLÉN, C.; HÖGLUND, P.; FRANKSSON, L.; KÄRRE, K. The RMA-S lymphoma mutant; consequences of a peptide loading defect on immunological recognition and graft rejection. **International journal of cancer**, v. 6, p. 38-44, jan 1991.

LOMBARDI, C.; BORGES, P. C.; CHAUL, A. *et al.* Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). "The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research". **The Journal of investigative dermatology**, v. 98, n. 6, p. 847-50, jun 1992.

LONG, E. O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. **Annual review of immunology**, v. 17, p. 875-904, jan 1999.

LONG, E. O.; COLONNA, M.; LANIER, L. L. Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells: a standard nomenclature. **Immunology today**, v. 17, n. 2, p. 100, fev 1996.

MAHFOUZ, R.; RAYES, R.; MAHFOUD, Z.; BAZARBACHI, A.; ZAATARI, G. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genotypes in the Lebanese population. **Tissue antigens**, v. 68, n. 1, p. 66-71, jul 2006.

MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M. L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes and immunity**, v. 10, n. 6, p. 547-58, set 2009.

MARTIN, A. M.; FREITAS, E. M.; WITT, C S; CHRISTIANSEN, F T. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. **Immunogenetics**, v. 51, n. 4-5, p. 268-80, abr 2000.

MARTIN, M. P; BASHIROVA, A.; TRAHERNE, J.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. **Journal of immunology**, v. 171, n. 5, p. 2192-5, 1 set 2003.

MARTIN, M. P; NELSON, G.; LEE, J. H. *et al.* Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. **Journal of immunology**, v. 169, n. 6, p. 2818-22, 15 set 2002.

MAXWELL, L. D.; WALLACE, A.; MIDDLETON, D; CURRAN, M. D. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. **Tissue antigens**, v. 60, n. 3, p. 254-8, set 2002.

MIDDLETON, D; MEENAGH, A.; MOSCOSO, J.; ARNAIZ-VILLENA, A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. **Tissue antigens**, v. 71, n. 2, p. 105-13, fev 2008.

MIYASHITA, R.; TSUCHIYA, N.; YABE, T. *et al.* Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with microscopic polyangiitis. **Arthritis and rheumatism**, v. 54, n. 3, p. 992-7, mar 2006.

MOGAMI, S.; HASEGAWA, G.; NAKAYAMA, I. *et al.* Killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes in Japanese patients with type 1 diabetes. **Tissue antigens**, v. 70, n. 6, p. 506-10, dez 2007.

MOESTA, A. K.; NORMAN, PAUL J; YAWATA, M. *et al.* Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 6, p. 3969-79, 15 mar 2008.

MORETTA, A.; BOTTINO, C.; VITALE, M. *et al.* Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. **Annual review of immunology**, v. 14, p. 619-48, jan 1996.

MORETTA, A.; VITALE, M.; BOTTINO, C. *et al.* P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 2, p. 597-604, 1 ago 1993.

NORMAN, P. J.; CARRINGTON, C. V. F.; BYNG, M. *et al.* Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. **Genes and immunity**, v. 3, n. 2, p. 86-95, abr 2002.

NORMAN, P. J.; ABI-RACHED, L.; GENDZEKHADZE, K. *et al.* Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes, alleles, and haplotypes. **Genome research**, v. 19, n. 5, p. 757-69, maio 2009.

NORMAN, P. J; ABI-RACHED, L.; GENDZEKHADZE, K. *et al.* Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. **Nature genetics**, v. 39, n. 9, p. 1092-9, set 2007.



ORTONNE, N.; GOUVELLO, S. LE; MANSOUR, H. *et al.* CD158K/KIR3DL2 transcript detection in lesional skin of patients with erythroderma is a tool for the diagnosis of Sézary syndrome. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 2, p. 465-72, fev 2008.

PARHAM, P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. **Molecular immunology**, v. 42, n. 4, p. 459-62, fev 2005.

PARHAM, P.; MCQUEEN, K. L. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 2, p. 108-22, fev 2003.

PAVONI, D. P.; ROXO, V M M S; MARQUART FILHO, A.; PETZL-ERLER, M. L. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and immunity**, v. 4, n. 2, p. 110-6, mar 2003.

PEREIRA, N. F.; HANSEN, J. A.; LIN, M.-T. *et al.* Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine**, v. 28, n. 6, p. 233-41, 21 dez 2004.

PETZL-ERLER, M L; SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue antigens**, v. 33, n. 3, p. 408-14, mar 1989.

PETZL-ERLER, M. L.; MALHEIROS, D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: is there any relationship? **Journal of autoimmunity**, v. 25, n. 2, p. 121-5, set 2005.

QUINNAN, G. V.; MANISCHEWITZ, J. F.; KIRMANI, N. Involvement of natural killer cells in the pathogenesis of murine cytomegalovirus interstitial pneumonitis and the immune response to infection. **The Journal of general virology**, v. 58 Pt 1, p. 173-80, jan 1982.

RAJAGOPALAN, S.; FU, J.; LONG, E O. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. **Journal of immunology**, v. 167, n. 4, p. 1877-81, 15 ago 2001.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 7, p. 1093-100, 5 abr 1999.

RAJALINGAM, R.; KRAUSA, P.; SHILLING, H. G. *et al.* Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. **Immunogenetics**, v. 53, n. 12, p. 1009-19, mar 2002.

RAULET, D. H.; VANCE, R. E.; MCMAHON, C. W. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. **Annual review of immunology**, v. 19, p. 291-330, jan 2001.

RAULET, D. H.; GUERRA, N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 8, p. 568-80, ago 2009.

RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**, v. 273, n. 5281, p. 1516-7, 13 set 1996.

ROBINSON, J.; MISTRY, K.; MCWILLIAM, H.; LOPEZ, R.; MARSH, S. G. E. IPD--the Immuno Polymorphism Database. **Nucleic acids research**, v. 38, n. Database issue, p. D863-9, jan 2010.

ROSCOE, J. T.; DIAZ, L.; SAMPAIO, S. A. *et al.* Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. **The Journal of investigative dermatology**, v. 85, n. 6, p. 538-41, dez 1985.

SALAZAR-MATHER, T. P.; ISHIKAWA, R.; BIRON, C. A. NK cell trafficking and cytokine expression in splenic compartments after IFN induction and viral infection. **Journal of immunology**, v. 157, n. 7, p. 3054-64, 1 out 1996.

SHI, F. D.; WANG, H. G.; LI, H. *et al.* Natural killer cells determine the outcome of B cell – mediated autoimmunity. **America**, v. 1, n. 3, p. 245-251, 2000.

SIVORI, S.; FALCO, M.; MORETTA, L.; MORETTA, A. Extending killer Ig-like receptor function: from HLA class I recognition to sensors of microbial products. **Trends in immunology**, v. 31, n. 8, p. 289-94, ago 2010.

SLIK, A. R. VAN DER; KOELEMAN, B. P. C.; VERDUIJN, W. *et al.* KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. **Diabetes**, v. 52, n. 10, p. 2639-42, out 2003.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-95, nov 1989.

THANANCHAI, H.; GILLESPIE, G.; MARTIN, M. P.; *et al.* Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. **Journal of immunology**, v. 178, n. 1, p. 33-7, 1 jan 2007.

TONEVA, M.; LEPAGE, V.; LAFAY, G. *et al.* Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. **Tissue antigens**, v. 57, n. 4, p. 358-62, abr 2001.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. **Advances in immunology**, v. 47, p. 187-376, jan 1989.

TROWSDALE, J.; BARTEN, R.; HAUDE, A. *et al.* The genomic context of natural killer receptor extended gene families. **Immunological reviews**, v. 181, p. 20-38, jun 2001.

TUR, E.; BRENNER, S. Contributing exogenous factors in pemphigus. **International journal of dermatology**, v. 36, n. 12, p. 888-93, dez 1997.

TUR, E.; BRENNER, S. Diet and pemphigus. In pursuit of exogenous factors in pemphigus and fogo selvagem. **Archives of dermatology**, v. 134, n. 11, p. 1406-10, nov 1998.

UHRBERG, M.; PARHAM, P.; WERNET, P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. **Immunogenetics**, v. 54, n. 4, p. 221-9, jul 2002.

UHRBERG, M.; VALIANTE, N. M.; SHUM, B. P. *et al.* Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 753-63, dez 1997.

VALIANTE, N. M.; PARHAM, P. Natural killer cells, HLA class I molecules, and marrow transplantation. **Biology of blood and marrow transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 3, n. 5, p. 229-35, nov 1997.

VALIANTE, N. M.; UHRBERG, M; SHILLING, H G; *et al.* Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 739-51, dez 1997.

VILCHES, C; RAJALINGAM, R; UHRBERG, M; *et al.* KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains. **Journal of immunology**, v. 164, n. 11, p. 5797-804, 1 jun 2000.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 217-51, jan 2002.

VIVIER, E.; RAULET, D. H; MORETTA, A. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-9, 7 jan 2011.

VÉLY, F.; VIVIER, E. Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. **Journal of immunology**, v. 159, n. 5, p. 2075-7, 1 set 1997.

WANG, X. L.; WANG, Q.; SUN, C. J.; ZHANG, W. Y. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL2 in preeclampsia. **Journal of perinatal medicine**, v. 39, n. 3, p. 273-8, maio 2011.

WARREN, H S. NK cell proliferation and inflammation. **Immunology and cell biology**, v. 74, n. 5, p. 473-80, out 1996.

WATTERSON, G. A. The homozygosity test of neutrality. **Genetics**, v. 88, n. 2, p. 405-17, fev 1978.

WILSON, M J; TORKAR, M.; HAUDE, A. *et al.* Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 9, p. 4778-83, 25 abr 2000.

WITT, C S; DEWING, C.; SAYER, D. C. *et al.* Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. **Transplantation**, v. 68, n. 11, p. 1784-9, 15 dez 1999.

YAWATA, M.; YAWATA, N.; DRAGHI, M. *et al.* Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 3, p. 633-45, 20 mar 2006.

YAWATA, M.; YAWATA, N.; MCQUEEN, K. L. *et al.* Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. **Immunogenetics**, v. 54, n. 8, p. 543-50, nov 2002.

YEN, J. H.; MOORE, B. E.; NAKAJIMA, T. *et al.* Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 10, p. 1159-67, 21 maio 2001.

ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. **Nature**, v. 248, n. 450, p. 701-2, 19 abr 1974.

## **ANEXO: MATERIAL E MÉTODOS**

### **CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS**

Nos estudos populacionais e de associação ao PFE, várias amostras populacionais de diferentes ancestralidades foram analisadas, entre pacientes e controles para o estudo da doença PFE e populações indígenas do Paraná e Mato Grosso do Sul.

No estudo do PF, utilizamos uma amostra com um tamanho total de aproximadamente 437 indivíduos (233 pacientes, 204 controles), residentes principalmente no Estado Mato Grosso do Sul, subdivididas em dois grupos. Todos os indivíduos não possuem vínculos genéticos. Como se trata de populações heterogêneas e miscigenadas, os indivíduos foram classificados de acordo com características morfológicas faciais. Essa classificação permite, com uma margem de erro e dentro de certos limites, estimar a contribuição genética de cada indivíduo, no que se refere às parcelas ameríndias, européias e africanas. Tal classificação é baseada no formato de boca, nariz, olhos além de tipo de cabelo e cor de pele. Todos os indivíduos responderam um questionário com informações relevantes para o pareamento das duas subamostras, como ambiente e condições de vida, escolaridade, sexo, grupo étnico, entre outras.

#### **Pacientes**

A amostra de pacientes é composta de 233 indivíduos, provenientes na grande maioria, de coletas realizadas no Hospital Adventista do Pênfigo (HAP), em Campo Grande-MS. Das amostras de sangue 80 foram coletadas em 1997 e 1998, 47 amostras foram coletadas em 2002 e 2003. Outras 20 foram coletadas em 1988 no Hospital de Dermatologia Sanitária de Piraquara (PR). As demais amostras foram coletadas a partir de 2007, todas no HAP, no decorrer desse trabalho.

Todos os pacientes foram diagnosticados como portadores de PFE, através de aspectos clínicos, histológicos e imunoquímicos.

#### **Controles**

A amostra de controles é composta de aproximadamente 204 indivíduos, sendo 35 coletadas na Santa Casa de Misericórdia de Curitiba em 1997 e 1998; 142 coletadas no HAP

nos anos 1997/98, 2002/03; As demais amostras foram coletadas no HAP no decorrer desse trabalho.

### **Indígenas**

Foram analisados indivíduos das populações Guarani M'Byá (n=63), Guarani Kaiowá (n=144), Guarani Nandeva (n=76), Kaingang de Rio das Cobras (n=88) e Kaingang de Ivaí (KIV). As duas populações indígenas do Paraná (Guarani M'Byá e Kaingang) são residentes na cidade de Laranjeiras do Sul, no Estado do Paraná, no posto indígena Rio das Cobras. O posto Rio das Cobras possui aproximadamente 1600 habitantes, incluindo as duas tribos. Embora Kaingang e Guarani ocupem a mesma região geográfica, eles vivem isoladamente, devido a fortes barreiras culturais e, inclusive, linguagem diferente. Os Guarani Kaiowá são das aldeias Amambaí e Limão Verde, no município de Amambaí, no Mato Grosso do Sul, nas quais habitam, respectivamente, 4.500 e 460 indivíduos. Os Guarani Nandeva são de Amambaí e também Porto Lindo que tem 1.600 indivíduos e fica também no Mato Grosso do Sul e os Kaingang de Ivaí são do Paraná.

Kaingang e Guarani são os dois principais grupos indígenas do Brasil e estão distribuídos em 17 reservas sob jurisdição da FUNAI. Os índios Guarani pertencem ao tronco linguístico Tupi-Guarani e eles tiveram os primeiros contatos com os colonizadores espanhóis e portugueses a partir da descoberta de metais preciosos na Bacia do Prata, no século XVI. Os Kaingang pertencem ao grupo linguístico Macro-Gê, tendo os primeiros contatos com portugueses e espanhóis no século XVIII.

### **Japoneses**

Faz parte desse estudo uma amostra populacional composta de japoneses (n=46), nascidos no Brasil, mas com ascendência puramente nipônica, sem vínculo genético entre eles.

### **Africanos**

Uma amostra de africanos (n=11), nascidos em diversas localidades da África foi também analisada nesse trabalho. Trata-se, na sua maioria, de estudantes que migraram para o Brasil para estudo ou trabalho, sem nenhum grau de parentesco entre eles.

## COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DE DNA

Houve coleta de 15 a 30ml sangue periférico das amostras populacionais já caracterizadas e os doadores colaboraram de forma voluntária, preenchendo e assinando um termo de consentimento de participação do estudo. Todos foram informados da inexistência de qualquer benefício direto ou qualquer malefício com a pesquisa. Para que a identidade dos participantes permaneça em sigilo, foi estabelecido um código padronizado a cada um deles. No momento da coleta do sangue também foi registrado o sexo, idade, origem étnica, histórico de doenças na família, entre outras informações, que foram armazenadas em banco de dados do Microsoft Access. Todos foram também esclarecidos do objetivo do trabalho assim como suas perspectivas e assinaram um termo de consentimento à participação voluntária. Todas as informações são mantidas em sigilo e o projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Paraná, de acordo com as leis federais brasileiras.

A extração de DNA foi realizada através do método Fenol – Clorofórmio – Álcool Isoamílico (SAMBROOK et al., 1989). Após, uma alíquota foi diluída a concentração de 20ug/ul e conservado a -20.ºC, sendo essa a solução de uso. O restante do DNA armazenado a -70.ºC.

A coleta de sangue e extração do DNA foram realizadas por vários pesquisadores, em diferentes épocas, desde a década de 1980 até os dias atuais, sendo estocado no Laboratório de Genética Molecular Humana. Esse material é utilizado em diversas linhas de pesquisa.

## GENOTIPAGEM DE PRESENÇA E AUSÊNCIA DE KIR

O método escolhido para verificação de ausência e presença dos genes KIR foi o PCR-SSP, com dois pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene. Detalhes sobre a genotipagem, como condições de PCR e sequência dos oligonucleotídeos, podem ser encontradas no trabalho publicado por KULKARNI *et al.*, (2010).

## ANÁLISE DE PERFIS

A nomenclatura dos perfis KIR não é consensual e uma nomenclatura padronizada ainda não foi estabelecida. O banco de dados “Allele frequencies.net” (GONZALES-GALARZA, 2011) foi usado como referência para identificar os perfis e obter resultados para

comparações entre populações. Perfis únicos foram cuidadosamente analisados e retipados duas a três vezes para validar os resultados.

#### SEQUENCIAMENTO E GENOTIPAGEM DE *KIR3DL2*

A implementação da genotipagem em alta resolução por sequenciamento foi um dos objetivos dessa tese. Detalhes sobre a técnica, assim como o protocolo, são encontradas no manuscrito “*KIR3DL2 high resolution allele typing by the sequence-based typing (SBT) method*”, na seção de resultados dessa tese.

A confirmação dos alelos por clonagem foi feita utilizando *E. coli* H2B10 termocompetentes e o kit de transformação insTAclone™ (Fermentas) e transformação por choque térmico, seguida de sequenciamento dos alelos isoladamente.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os métodos utilizados nesse trabalho estão citados nos manuscritos que compõem a seção de resultados dessa tese.